

Aus dem  
Deutschen Herzzentrum und der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik,  
Klinikum rechts der Isar  
der  
Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**VASP – EIN ZENTRALER REGULATOR DER THROMBOZYTENFUNKTION**  
*IN VIVO*

Julia Caroline Kersting

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten  
Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Priv.-Doz. Dr. St. Maßberg (schriftliche Beurteilung)
	1. Priv.-Doz. Dr. D. Zohlhöfer (mündliche Prüfung)
	2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 15.02.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.11.2006 angenommen.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1	DIE GEFÄßWAND .....	4
1.1.1	Das Endothel .....	4
1.2	THROMBOZYTEN UND IHRE ROLLE INNERHALB DER HÄMOSTASE .....	5
1.2.1	Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	6
1.2.1.1	GPIIb-IIIa.....	7
1.2.1.2	P-Selektin.....	8
1.3	STICKSTOFFMONOXID UND SEIN WIRKMECHANISMUS.....	8
1.3.1	Das NO-System und sein biologische Effekt .....	8
1.3.2	NO-vermittelte Signaltransduktion in Thrombozyten.....	11
1.4	PROSTAZYKLIN UND SEIN WIRKMECHANISMUS IN THROMBOZYTEN.....	12
1.5	VASODILATOR-STIMULATED PHOSPHOPROTEIN (VASP).....	14
<b>2</b>	<b>ZIEL DER STUDIE.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
3.1	MATERIAL.....	19
3.1.1	Vorbemerkungen.....	19
3.1.2	Versuchstiere .....	19
3.2	METHODEN .....	20
3.2.1	In vivo Fluoreszenzmikroskopie.....	20
3.2.1.1	Technisches Setup .....	20
3.2.1.2	Narkose .....	21
3.2.1.3	Thrombozytenpräparation .....	21
3.2.1.4	Präparation des Empfängertieres.....	22
3.2.1.5	Mikroskopierraum .....	22
3.2.1.6	Auswertung der Videoaufnahmen.....	23
3.2.2	Histomorphometrie .....	23
3.3	VERWENDETE REAGENZIEN .....	25
3.3.1	Tyrode-Puffer.....	25
3.3.2	Paraformaldehyd.....	25
3.4	ARBEITSPROGRAMM .....	25
3.4.1	Einfluss von VASP auf die Thrombozytenadhäsion unter physiologischen Bedingungen in vivo .....	25
3.4.1.1	Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen in Wildtyp- und VASP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	25
3.4.1.2	Bedeutung von P-Selektin und GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion in VASP <sup>-/-</sup> -Mäusen. ..	26
3.4.2	Einfluss von VASP auf die Thrombozytenadhäsion unter pathophysiologischen Bedingungen in vivo ...	26
3.4.2.1	Thrombozytenadhäsion nach Reaktion auf Ischämie und Reperfusion .....	26
3.4.2.2	Thrombozytenadhäsion nach Gefäßverletzung – Effekt von NO .....	27
3.4.2.3	Bedeutung von GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion nach Endotheldenudation .....	28
3.4.2.4	Beurteilung der Thrombozytenadhäsion in ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	28
3.4.2.5	Bedeutung von VASP für das vaskuläre Remodeling .....	29
3.5	STATISTISCHE ANALYSEN .....	30
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
4.1	VASP REGULIERT DIE THROMBOZYTENADHÄSION UNTER <i>PHYSIOLOGISCHEN</i> BEDINGUNGEN <i>IN VIVO</i> .....	31

---

4.1.1	Verstärkte Thrombozyten-Endothelzellinteraktion in VASP-defizienten Mäusen .....	31
4.1.2	P-Selektin und GPIIb-IIIa vermitteln die transiente und feste Adhäsion von VASP <sup>-/-</sup> -Thrombozyten.....	32
4.2	VASP REGULIERT DIE THROMBOZYTENADHÄSION UNTER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IN VIVO .....	34
4.2.1	VASP reguliert die Thrombozytenadhäsion an das postischämisch veränderte Endothel von Mikrogefäßen .....	34
4.2.2	VASP <sup>-/-</sup> -Thrombozyten zeigen vermehrte Adhäsion nach endothelialer Denudation .....	36
4.2.3	GPIIb-IIIa vermittelt die Adhäsion von VASP <sup>-/-</sup> -Thrombozyten an die subendotheliale Matrix. ....	37
4.2.4	VASP <sup>-/-</sup> -Thrombozyten sprechen nicht auf Stickstoffmonoxid an.....	38
4.2.5	VASP reguliert die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion in der frühen Atherosklerose .....	40
4.2.6	Der Verlust von VASP induziert die Mediahypertrophie .....	42
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>44</b>
5.1	DISKUSSION DER ANGEWANDTEN EXPERIMENTELLEN VERFAHREN .....	44
5.1.1	Das Tiermodell .....	44
5.1.2	Intravitalmikroskopische Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktionen.....	45
5.1.3	Histomorphometrische Charakterisierung und Quantifizierung der Atherosklerose.....	46
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	48
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>71</b>

## **1 EINLEITUNG**

Artherosklerotische Gefäßläsionen sind die Hauptursache ischämischer Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall. In den westlichen Nationen sind ca. 30% der Todesfälle auf Erkrankungen zurückzuführen, die auf thrombotisch-ischämischen Gefäßveränderungen basieren. Im Jahr 2001 starben in Deutschland nach Angaben des statistischen Bundesamtes 245.000 Menschen an koronarer Herzerkrankung und den Folgen des Herzinfarktes.

Als Reaktion auf die steigende Inzidenz atherosklerotischer Erkrankungen ergeben sich zwei wichtige Konsequenzen für die moderne Medizin. Auf der einen Seite steht die Therapie, die bei Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms die Mortalität zu senken vermag.<sup>98</sup> Auf der anderen Seite stehen die Prävention und damit die Reduktion der Inzidenz atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Sie nimmt bei den kontinuierlich ansteigenden Zahlen erkrankter Personen eine große Bedeutung ein.<sup>67</sup> Um präventive Maßnahmen und neue therapeutische Strategien auszubauen und zu optimieren, ist es unerlässlich, die zugrunde liegenden Pathomechanismen besser zu verstehen.

Interaktionen zwischen Blutzellen und der Gefäßwand spielen eine herausragende Rolle für die Manifestation der Atherosklerose und ihrer Komplikationen. Die Regulation der Zell-Gefäßwandinteraktionen ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Zellen und Regulatorproteine. Vor allem Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen sind daran beteiligt. In der vorliegenden Studie stehen die Analyse der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung von Thrombozyten und ihr Adhäsionsverhalten an die Gefäßwand im Mittelpunkt. Dabei soll der Einfluss eines insbesondere in Thrombozyten und aber beispielsweise auch in Endothelzellen exprimierten Proteins auf die Funktion von Thrombozyten näher analysiert werden. Das vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) ist ein 46kDa Protein menschlicher Thrombozyten, das unter dem Einfluss von Vasodilatoren wie Prostazyklin und NO in den phosphorylierten Zustand übergeht.<sup>31</sup> Die Rolle von VASP bei der Regulation der Thrombozytenadhäsion konnte bislang nicht geklärt werden. Ziel der Arbeit ist es, die Bedeutung von VASP im Bezug auf diese Mechanismen herauszuarbeiten und anhand verschiedener Versuchsansätze dessen

Einfluss unter *physiologischen* und *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo* zu analysieren.

## 1.1 DIE GEFÄßWAND

Der Aufbau der Arterienwand gleicht drei ineinander geschobenen Röhren. Die Intima bildet die innerste Schicht. Sie lässt sich in das einschichtige Endothel (Lamina endothelialis), eine Basalmembran und das bindegewebigen Subendothel (Stratum subendotheliale) unterteilen. Es folgt die Membrana elastica interna, die die Intima von der Media trennt. Die mittlere Schicht der Gefäßwand zeichnet sich durch mehrere Lagen glatter Muskulatur und einen variablen Anteil elastischer oder kollagener Fasern aus. Die sich anschließende Membrana elastica externa trennt wiederum die Media von der außen gelegenen Adventitia. Diese besteht aus einem Netzverband fibroelastischer Fasern des Kollagen-Typs I. Sie ist mit dem Bindegewebe des Organs verbunden, durch das der jeweilige Gefäßabschnitt läuft.<sup>39</sup>

### 1.1.1 Das Endothel

Das Endothel ist das größte autokrine, parakrine und endokrine Organ des Körpers. Es umfasst beim Menschen eine Fläche von etwa 700m<sup>2</sup> bei einem Gewicht von ca. 1,5 kg.<sup>39,99</sup> Die Endothelzellen der Intima sind maßgeblich daran beteiligt, die Homöostase und Integrität der Gefäßwand aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus ist es eine biochemisch aktive Oberfläche, die den thrombogenetischen Prozess kontrolliert und für die Regulation essentieller Funktionen wie Gefäßreparatur, Gefäßtonus, Entzündungsreaktionen und immunologische Prozesse verantwortlich ist.<sup>8</sup> Unter physiologischen Bedingungen agiert das Endothel als eine anti-thrombogene Oberfläche, die die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten verhindert. Es wirkt einer Fibrinablagerung und Thrombinbildung entgegen und fördert darüber hinaus die Bildung vasoaktiver Substanzen. Unter der Einwirkung physikalischer und inflammatorischer Reize wandelt sich das Endothel in eine proadhäsive und prokoagulatorische Oberfläche um. Das physiologische Endothel wird in diesem Zustand zu einem dysfunktionelles Endothel.<sup>6,99</sup> Mögliche Trig-

ger einer endothelialen Dysfunktion sind über viele Jahre einwirkende pathologische Stimuli, wie chronische Hypertension, Dyslipidämie, freie Radikale durch Nikotinabusus, Diabetes mellitus, genetische Veränderungen und die Kombination dieser Faktoren.

Im Prozess der Dysfunktion kommt es zur vermehrten Expression des von Willebrand Faktors (vWF), der im Zusammenhang mit der Interaktion von Thrombozyten und der Gefäßwand steht.<sup>73</sup> Darüber hinaus werden zahlreiche weitere thrombozytäre und endotheliale Faktoren aktiviert. Ein weiteres wichtiges System, das im Zustand endothelialer Dysfunktion in seiner Funktion gestört wird, ist das Stickstoffmonoxid-System und damit die endothelabhängige Relaxation. Auf die Bedeutung dieses Regelkreises und die Auswirkung einer endothelialen Dysfunktion wird im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen.

Charakteristisch für den Effekt einer endothelialen Dysfunktion sind eine gesteigerte Adhäsion sowohl von Thrombozyten als auch von Leukozyten an die intakte Endothelzellschicht.<sup>85</sup> Dies führt zu verstärkter Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaktivierung, sowie zu vermehrter Leukozytenaktivierung. Des Weiteren kommt es zu einer veränderten Vasoreaktivität mit Vasokonstriktion.<sup>54,89</sup> Zusätzlich wird die Proliferation glatter Muskelzellen der Media gefördert. Schon in zahlreichen früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde betont, dass Thrombozyten direkt an das intakte Endothel - ohne Vorliegen einer Endothelschädigung - adhären können.<sup>22,23,52,53</sup> Die Adhäsion führt im Weiteren zur vermehrten Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, was einen frühen Schritt im atherosklerotischen Geschehen darstellt. Am Ende steht schließlich die atherosklerotische Plaque und der Verschluss des Gefäßes, was zum klinischen Bild des Myokardinfakts und Schlaganfalls führt.

## **1.2 THROMBOZYTEN UND IHRE ROLLE INNERHALB DER HÄMOSTASE**

Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Im peripheren Blut sind sie die kleinsten korpuskulären Bestandteile mit einem Durchmesser von 2 bis 4µm. Ihre physiologische Konzentration liegt beim gesunden Menschen bei 150000 bis 450000 pro µl Blut.<sup>7,65,103</sup> Thrombozyten werden aufgrund ihrer Kernlosigkeit als anukleäre Zellen bezeichnet. Die durchschnittliche Überlebenszeit im peripheren Blut ist mit 7-10

Tagen relativ kurz, wobei ca. 70% ihres Bestandes im Blut zirkuliert und 30% in der Milz gespeichert sind. Der Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und Milz.

Im nicht-aktivierten Zustand zeigen Thrombozyten eine typische diskoide Gestalt mit einer durchschnittlichen Oberfläche von  $8\mu\text{m}^2$ . Die Aktivierung durch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin führt zur Änderung ihrer Form mit Ausbildung von Plasmamembranausläufern, den so genannten Pseudopodien. Auf diese Weise vergrößert sich ihre Oberfläche auf  $13\mu\text{m}^2$ .<sup>105</sup> Thrombozyten sind einerseits für die Blutstillung und andererseits für die Einleitung der Gerinnung verantwortlich. Der Kontakt mit löslichen Agonisten (ADP, Thrombin, Kollagen, Fibrinogen, Thromboxan  $A_2$ ), mit freiliegenden subendothelialen Strukturen (vWF, Kollagen, Fibronectin) oder dem dysfunktionellen Endothel (endothelialer vWF, GPIIb-IIIa, P-Selektin) aktiviert Thrombozyten und initiiert deren Adhäsion an die Gefäßwand. Durch die Entleerung thrombozytärer Granula und Ausschüttung weiterer Mediatoren werden erneut Thrombozyten rekrutiert und zahlreiche Zell-Oberflächen- und Zell-Zell-Interaktionen in Gang gesetzt. Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche spielen bei der Adhäsion eine zentrale Rolle.<sup>8</sup> Im Rahmen der Adhäsion werden proinflammatorische und chemotaktisch aktive Zytokine, sowie vasoaktive Substanzen freigesetzt.<sup>8</sup> Dem Prozess der Thrombozytenadhäsion und -aktivierung wirken endotheliale Faktoren entgegen. Insbesondere vasodilatierende Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin wirken antikoagulatorisch sowie antiadhäsiv und induzieren die Dilatation des Gefäßes. Sie fördern die Ausschwemmung prokoagulatorischer Substanzen und vermindern den Kontakt der Thrombozyten mit der Gefäßwand. Des Weiteren wird diesen Substanzen ein direkter Effekt auf die Thrombozytenaktivität und Adhäsion zellulärer Elemente an das Endothel zugesprochen<sup>8</sup>, auf den im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen wird.

### **1.2.1 Thrombozytäre Membranglykoproteine**

Die Mechanismen während der Hämostase und Gerinnung setzen ein enges und geordnetes Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, Strukturen der Gefäßwand und plasmatischen Gerinnungsfaktoren voraus. Adhäsionsprozesse, die durch zahlreiche

spezifische Adhäsionsrezeptoren reguliert werden, spielen eine zentrale Rolle in diesem Geschehen. Thrombozyten exprimieren Glykoproteine auf ihrer Membran, die Interaktionen untereinander (GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (vWF, Kollagen), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (vWF), sowie mit Endothelzellen (GPIIb-IIIa) und Leukozyten (P-Selektin) ermöglichen. Sie werden gemäß ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen eingeteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp.<sup>40,73</sup>

Zwei dieser Proteine spielen für die im weiteren Verlauf dieser Studie durchgeführten Versuche eine wichtige Rolle und sollen deswegen gesondert erwähnt werden. Es handelt sich um den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa, der zu den  $\beta_3$ - Integrinen gehört, und das P-Selektin, das zu den Selektinen zählt.

#### 1.2.1.1 GPIIb-IIIa

Glykoprotein I Ib-IIIa wird auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet und gehört zu den  $\beta_3$ -Integrinen auf Thrombozyten. Es ist Bestandteil der  $\alpha$ -Granula und der thrombozytären Plasmamembran. Mengenmäßig steht es mit einer Oberflächenbesetzung von 60.000 bis 100.000 Rezeptoren pro Thrombozyt an erster Stelle thrombozytärer Membranglykoproteine.<sup>16,44,50</sup> Die Hauptfunktion des Fibrinogenrezeptors besteht darin, Fibrin an der Thrombozytenoberfläche zu binden und somit die ersten Schritte der Thrombozytenaggregation einzuleiten. Ist ein Thrombozyt im nicht aktivierten Zustand, ist der Fibrinogenrezeptor an der Oberfläche im Ruhezustand und bindet nur Fibrin und immobilisiertes Fibrinogen, das nicht im Plasma gelöst ist. Nach Aktivierung kommt es zu einer raschen Konformationsänderung des Rezeptors mit Übergang in den aktiven hochaffinen Zustand, was die Bindung von im Plasma gelöstem Fibrinogen an Thrombozyten zur Folge hat. Diese Konformationsänderung wird durch Thrombozytenagonisten wie ADP und Thrombin induziert.<sup>9</sup> GPIIb-IIIa vermittelt die Aggregation von Thrombozyten und die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an die intakte Endothelzellschicht.<sup>9,85</sup> *In vitro* induziert die feste Adhäsion von Thrombozyten eine inflammatorische Reaktion der Endothelzellen, was damit wiederum zu vermehrt adhäsiven Eigenschaften und proteolytischer Aktivität des Endothels führt.<sup>57</sup>

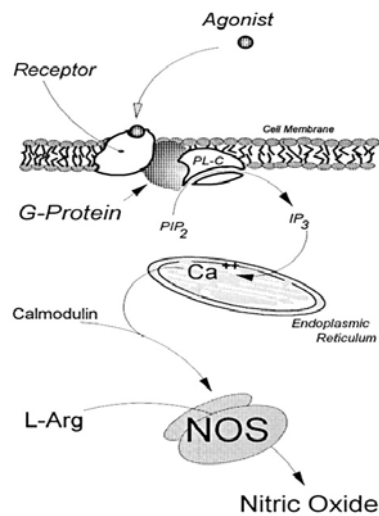


### 1.2.1.2 P-Selektin

P-Selektin gehört zu den vaskulären Adhäsionsrezeptoren, die unterschiedliche Zellinteraktionen vermitteln. Es kommt sowohl in Thrombozyten als auch in Endothelzellen vor. In Thrombozyten wird es in den  $\alpha$ -Granula gespeichert, im Endothel in den Weibel-Palade-Körperchen. Sind diese Zellen im Ruhezustand, wird der Rezeptor nicht an der Zelloberfläche exprimiert. Nach Aktivierung kommt es zur vermehrten Freisetzung und Oberflächenexpression. Dies fördert am Endothel und an bereits adhärenen Thrombozyten die Adhäsion von Leukozyten („rolling“).

## 1.3 STICKSTOFFMONOXID UND SEIN WIRKMECHANISMUS

### 1.3.1 Das NO-System und sein biologischer Effekt



**Abbildung 1:**

*Darstellung des Entstehungsmechanismus von NO. Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Konzentration bestimmt die Aktivität der NO-Synthase, die aus L-Arginin NO synthetisiert.<sup>89</sup>*

Die Adhäsion von Thrombozyten am Endothel spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen. Nach Aktivierung setzen Thrombozyten proinflammatorische Mediatoren frei und initiieren die Expression von endothelialen Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Die rezeptorvermittelte Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen wird durch ein komplexes Netzwerk humoraler Faktoren moduliert. Stickstoffmonoxid und das NO/cGMP/cGMP-Proteinkinase-I-System als ein Inhibitor der Thrombozyten sind dabei sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen von außerordentlicher Bedeutung.<sup>48</sup> Das farb- und geruchlose Gas NO mit guter Wasserlöslichkeit eignet sich wegen seiner kleinen Größe und Lipophilie hervorragend als zellulärer Botenstoff.<sup>37</sup> Stickstoffmonoxid (NO = nitric oxide) wird von NO-Synthasen aus der terminalen Guanidino-Nitrogengruppe des L-Arginin gebildet, deren Aktivität engmaschig durch die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration reguliert wird (*Abb. 1*). Die Synthasen sind monomere Proteine der Zellmembran mit Ähnlichkeit zu Cytochrom P450. Es wurden bereits 3 Isoformen des Enzyms identifiziert: die neuronale Isoform (nNOS), die induzierbare Isoform (iNOS) und die endotheliale, konstitutiv exprimierte Isoform (eNOS).<sup>58</sup> Die Aktivität der eNOS, die von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird, ist von  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängig. Mit Anstieg des intrazellulären Kalziums steigt die Aktivität des Enzyms. Darüber hinaus gibt es weitere kalziumunabhängige Mechanismen zur Regulation der eNOS in Thrombozyten und Endothelzellen, die bisher jedoch nur unzureichend bekannt sind. Neben einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von eNOS und der Interaktion mit regulatorischen Proteinen, modulieren Phosphorylierungsprozesse die Aktivität des Enzyms.<sup>15,106</sup> Aggregierende Thrombozyten vermitteln schließlich selbst die Freisetzung von NO durch Adenosindiphosphat, Thromboxan<sub>A2</sub> und Serotonin.

Unter physiologischen Ruhebedingungen ist die  $Ca^{2+}$ -abhängige NO-Synthase der Endothelzellmembran für die kontinuierliche vaskuläre Ausschüttung von NO zuständig.<sup>21</sup> Durch das vom Endothel gebildete NO wird die koagulatorische Aktivität der Thrombozyten reduziert. Dies umfasst die Adhäsion<sup>95</sup>, die Aggregation<sup>4,54,59,62</sup>, die Sekretion<sup>46</sup> und Rekrutierung weiterer Thrombozyten.<sup>21</sup>

Darüber hinaus hat die Bildung von endotheliale NO entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Vasomotion. Es wirkt an den glatten Muskelzellen der Gefäßwand als

wichtigster bekannter Vasodilatator, wodurch der vaskuläre Tonus den physiologischen Gegebenheiten angepasst wird.<sup>10</sup>

Der aktivitätsabhängige Anstieg der endothelialen und thrombozytären Oberflächenexpression von P-Selektin und dem thrombozytären GPIIb-IIIa-Komplex wird ebenfalls durch NO gehemmt. Wie bereits dargestellt, vermittelt P-Selektin und GPIIb-IIIa die Adhäsion von Thrombozyten an dysfunktionelles Endothel. Der hemmende Effekt von NO auf die Oberflächenexpression von P-Selektin und den GPIIb-IIIa-Aktivitätszustandes geht mit vermindertem Leukozyten-„rolling“ und verminderter Bindung von Fibrinogen an den thrombozytären Membranrezeptor einher.<sup>17,60</sup>

Eine Reihe von Studien haben des Weiteren gezeigt, dass NO die Monozytenadhäsion an das Endothel und die Zellproliferation im Atheroskleroseprozess hemmt<sup>14,18,69</sup> und schließlich die Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen nach Ischämie und Reperfusion mindert.<sup>75</sup>

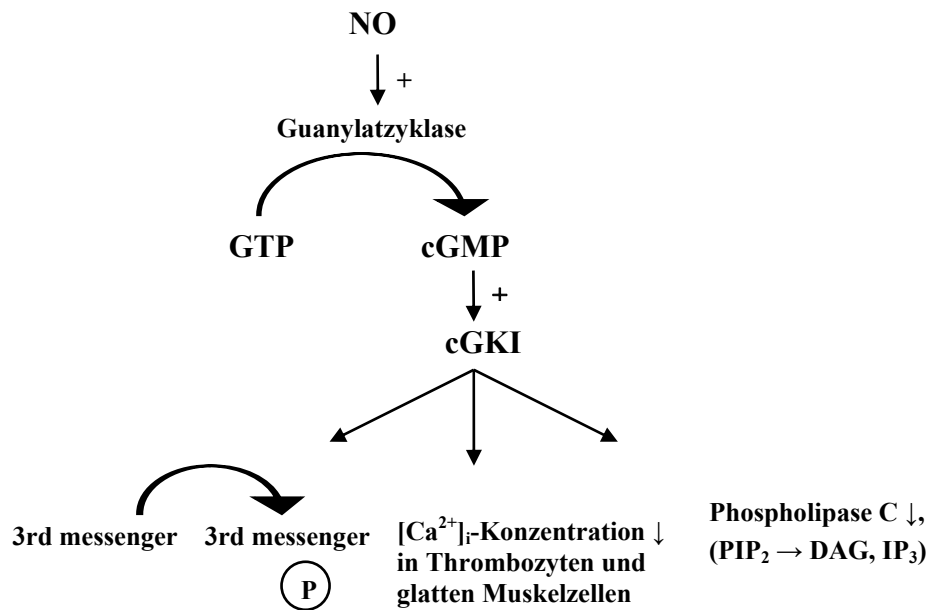
Nach Aktivierung von Thrombozyten oder Verletzung des Endothels spielt NO, das von thrombozytären NO-Synthasen gebildet wird, eine entscheidende Rolle. Im Rahmen einer früheren Untersuchung wurden bei der direkten Messung der NO-Produktion in Thrombozyten nach vorheriger Aktivierung signifikant höhere NO-Konzentrationen gemessen.<sup>21</sup> Dies macht deutlich, dass Thrombozyten in der Lage sind, ihr Adhäsions- und Aggregationsverhalten durch auto- und parakrine Mechanismen selbst zu regulieren.<sup>54</sup> Sowohl endotheliales als auch thrombozytäres NO spielt eine herausragende Rolle innerhalb der Regulation der Thrombozyten, sowie der Regulation des Vasotonus. Beide Prozesse sind immens wichtig für die Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts. Eine Störung dieser Mechanismen im Zustand der endothelialen Dysfunktion bildet in der Folge die Entstehungsgrundlage atherosklerotischer Gefäßveränderungen und thrombotischer Komplikationen.

Im Bereich atherosklerotischer Läsionen ist die endotheliale NO-Synthese beeinträchtigt (Endotheldysfunktion), so dass hier vermutlich die thrombozytäre NO-Synthese eine herausragende Rolle für die negative Regulation der Zell-Zell-Interaktionen spielt. Die genaue Bedeutung des thrombozytären versus endothelialen NO-Systems *in vivo* ist jedoch bislang unzureichend geklärt und bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen. Die genauen NO-vermittelten Signalwege sind im Detail nicht geklärt. Bekannt ist, dass

die Wirkung von NO wesentlich durch das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt wird. Auf diese Signaltransduktionskaskade wird im Folgenden näher eingegangen.

### **1.3.2 NO-vermittelte Signaltransduktion in Thrombozyten**

Nach Freisetzung aus Endothelzellen und Thrombozyten diffundiert NO in die Zielzellen. Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wird daraufhin nach Aktivierung einer löslichen Guanylatzyklase durch NO vermehrt aus GTP gebildet (*Abb.2*). Ansteigende Konzentrationen von cGMP führen neben einer verminderten Aktivität der Phospholipase C zur Hemmung der Inositol 1,4,5-Triphosphatbildung und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation (*Abb.2*).<sup>47,64</sup> Die genannten inhibitorischen Effekte werden durch eine cGMP-abhängige Proteinkinase vermittelt. Die in Thrombozyten vorkommende Proteinkinase I (cGKI) phosphoryliert im weiteren Verlauf der Signaltransduktionskaskade weitere 3rd Messenger (*Abb.2*). Ein wesentliches Substrat ist hier das Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP). VASP als Mediator der Wirkung von NO und seine Bedeutung für die Adhäsion von Thrombozyten wird im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen dieser Arbeit stehen.



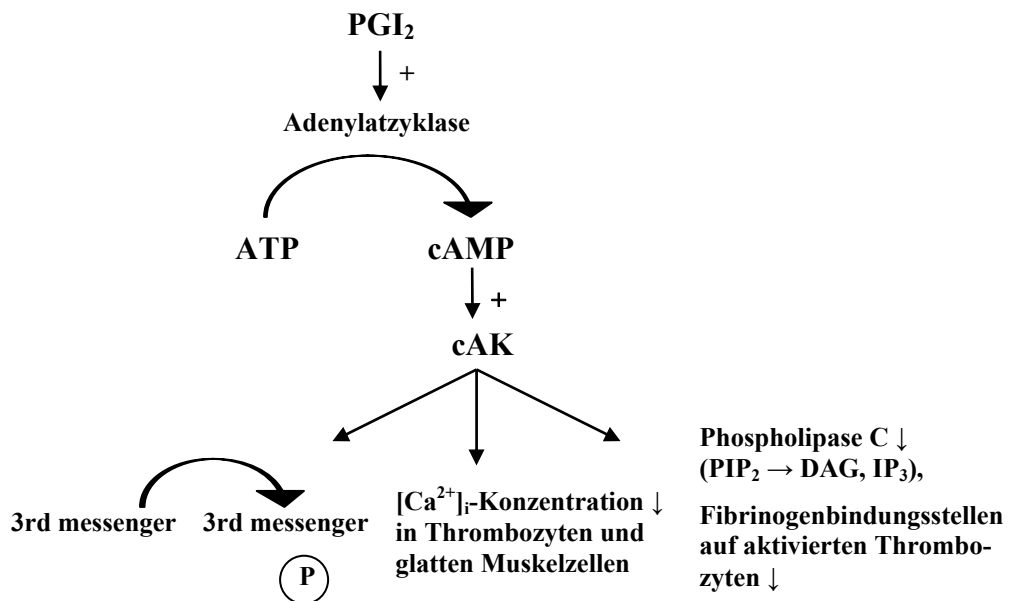
**Abbildung 2:**

*NO/cGMP/cGKI-Signaltransduktionskaskade in Thrombozyten. Nach Stimulation der NOS durch Acetylcholin, ATP, Serotonin, Norepinephrine, Substanz P und PAF wird vermehrt NO freigesetzt, was durch Erhöhung der cGMP-Konzentration über Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) zu unterschiedlichen Effekten führt. Es bewirkt eine Inhibition von Thrombozyten durch Phosphorylierung von 3rd messengern, Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Thrombozyten und glatten Muskelzellen und Hemmung der Phospholipase C. NO = nitric oxid, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, cGKI = cGMP-abhängige Proteinkinase I, NOS = NO-Synthasen, ATP = Adenosintriphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, P = phosphorylierter Zustand,  $[Ca^{2+}]_i$  = intrazelluläre Kalziumkonzentration*

## 1.4 PROSTAZYKLIN UND SEIN WIRKMECHANISMUS IN THROMBOZYTEN

Neben NO stellt Prostazyklin ( $PGI_2$ ) eine weitere antithrombotische Strategie des Endothels dar.  $PGI_2$  wird normalerweise vom inaktiven Endothel ausgeschüttet. Nach Stimulation durch Thrombin, Bradykinin, Histamin, ATP oder Thromboxan ( $TxA_2$ ) wird seine Freisetzung gesteigert.<sup>51</sup> Ebenso wie Thromboxan  $A_2$  ist Prostazyklin ein Arachidonsäurederivat, das aus Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) gebildet wird.  $PGI_2$  induziert die Aktivierung der  $G_s$ -proteingekoppelten Adenylatzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten. Es wird vermehrt ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt,

was zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg führt (*Abb.3*). Die cAMP vermittelte Hemmung der Thrombozytenaktivierung geschieht bereits bei physiologischen Konzentrationen in Thrombozyten. Dies lässt vermuten, dass PGI<sub>2</sub> zur basalen Kontrolle der Thrombozytenaktivität beiträgt.<sup>101</sup> Schon geringfügig ansteigende cAMP-Konzentrationen erhöhen die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK), sowie weiteren Proteinkinasen (*Abb.3*). Durch Phosphorylierung wird die Aktivität der Phospholipase C herabgesetzt. Andererseits hemmt cAMP eine weitere Proteinkinase, die intrazelluläres Kalzium bindet, was eine geringere Verfügbarkeit von Kalzium in Thrombozyten und glatten Muskelzellen zur Folge hat.<sup>42</sup> Schließlich führt der Anstieg von cAMP zu einer Inhibition von GPIIb/IIIa und damit zur reduzierten Bereitstellung von Fibrinogenbindungsstellen auf aktivierten Thrombozyten (*Abb.3*).<sup>34</sup> Unter dem Einfluss von Prostazyklin kommt es wiederum zur Phosphorylierung von 3rd Messengern. VASP ist hier ebenfalls ein wesentliches Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Somit stellt das Protein die gemeinsame Endstrecke der beiden Signaltransduktionswege dar. Es vermittelt damit die Wirkung von NO und Prostazyklin und hat entscheidenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion *in vivo*, wie im weiteren Verlauf der Arbeit deutlich werden soll.



**Abbildung 3:**

*PGI<sub>2</sub>/cAMP/cAK-Signaltransduktionskaskade in Thrombozyten. Nach Stimulation durch Thrombin, Bradykinin, Histamin, ATP oder Thromboxan (TxA<sub>2</sub>) wird vermehrt Prostacyclin freigesetzt, was durch den Anstieg von cAMP und die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase zu unterschiedlichen Effekten führt. Es bewirkt eine Inhibition der Thrombozytenfunktion durch Phosphorylierung von 3rd messengern, Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration, Verminderung von Fibrinogenbindungsstellen und Hemmung der Phospholipase C. PGI<sub>2</sub> = Prostacyclin-2, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, cAK = cAMP-abhängige Proteinkinase, ATP = Adenositriphosphat, P = phosphorylierter Zustand, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = intrazelluläre Kalziumkonzentration.*

## 1.5 VASODILATOR-STIMULATED PHOSPHOPROTEIN (VASP)

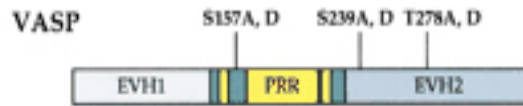
In den vorangehenden Abschnitten wurde deutlich, dass sowohl NO als auch Prostacyclin einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen hat. Der Wirkmechanismus erfolgt über den Anstieg des thrombozytären cGMP und cAMP durch Aktivierung einer löslichen Guanylat- beziehungsweise Adenylatzyklase.<sup>49,78,92</sup> Das nächste wichtige Zielprotein der NO/cGMP- und Prostacyclin/cAMP-Signaltransduktionskaskade innerhalb der Thrombozyten ist in einem Fall die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) und im anderen Fall die cAMP-abhängige

Proteinkinase (cAK) (*Abb.2;Abb.3*).<sup>54,66,92</sup> Gemeinsames Substrat beider Proteinkinasen ist das vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP).<sup>30,72,100</sup> VASP wurde erstmals aus menschlichen Thrombozyten isoliert, wird aber auch in einer Vielzahl anderer Zellen und Geweben exprimiert.<sup>80</sup> Es gehört zu der Familie der prolinreichen Proteine, die auch als Ena/VASP-Proteinfamilie bezeichnet wird. Sie umfasst das vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP), das Drosophila Enabled Protein (Ena), ein Substrat der Abelson Thyrosinkinase (Abl), das Ena-homologe Protein der Säugetiere Mena (m = mammalian) und das Protein mit Ähnlichkeit zu Ena-VASP Evi (Ena-VASP-like protein).<sup>26,27,29</sup> Alle diese Proteine bestehen aus zentralen prolinreichen und N- und C-terminalen homologen Domänen, die auch als Ena-VASP homologe Domäne 1 und 2 (EVH1, EVH2) bezeichnet werden (*Abb.4*).<sup>26,27,29</sup> Ena/VASP-Proteine sind Bestandteile der Zellmatrix und des Aktinzytoskeletts.<sup>27,80</sup> In Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten steht VASP vor allem im Zusammenhang mit fokaler Adhäsion, elastischen Fasern, Zellkontakten und hochdynamischen Regionen der Plasmamembran.<sup>80,84</sup> VASP bindet direkt an Profilin, Zyxin und an das Protein Vinculin, das bei der Adhäsion und dem Kontakt der Zellen untereinander von Bedeutung ist.<sup>1,26,27,29,70,81,82,83,84</sup> Es spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytoskelettalen (Re-)Organisation und Zellmobilität.<sup>13,19,24,41,56,74,84</sup>

In Thrombozyten ist VASP, wie oben bereits dargestellt, an der Schnittstelle zweier hauptsächlich inhibitorisch wirkender Signalwege (NO und PGI<sub>2</sub>) lokalisiert. Nach Konzentrationserhöhung zyklischer Nukleotide durch die Thrombozyten-Antagonisten NO und Prostazyklin, wird VASP an den Stellen Serin-157, Serin-239 und Threonin-278 von den Proteinkinasen cGKI und cAK phosphoryliert (*Abb.4*).<sup>12,31,94</sup> Dies hat eine Veränderung des Molekulargewichts von 46kDa auf 50kDa zur Folge.<sup>33</sup> Die genauen Effekte von VASP sind bislang nicht im Detail geklärt. Man weiß, dass die Phosphorylierung von VASP in engem Zusammenhang mit der Inhibition von Thrombozyten und gleichzeitiger Hemmung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa und seines Aktivitätszustandes steht (*Abb.5*).<sup>31,36</sup> Analog zeigen VASP-defiziente Thrombozyten eine erhöhte agonisteninduzierte Aktivität der P-Selektin-Expression und Fibrinogenbindung an das GPIIb-IIIa-Integrin auf Thrombozyten (*Abb.5*).<sup>3,33</sup>

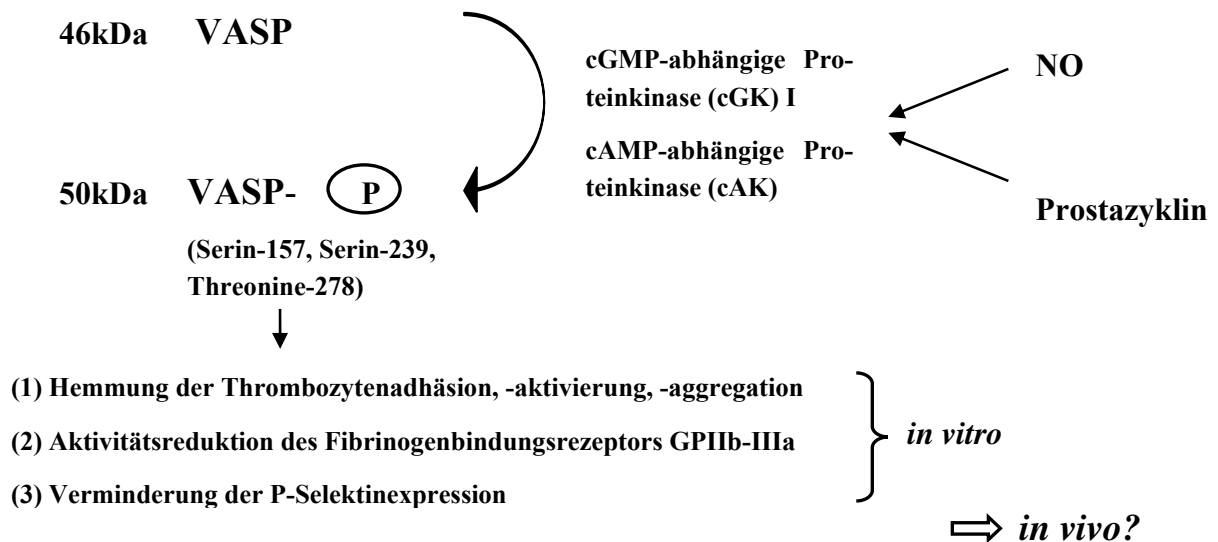


Daraus ergibt sich die Erkenntnis, dass VASP *in vitro* eine zentrale Rolle innerhalb der Regulation der Thrombozytenaktivität einnimmt. Eine wichtige, bisher aber noch unbeantwortete Frage stellt sich nun vor diesem Hintergrund: Welche Rolle spielt VASP für die Regulation der Thrombozytenfunktion *in vivo*?



**Abbildung 4:**

**Aufbau von VASP.** Es besteht aus der zentralen prolinreichen Domäne (PR) mit den angrenzenden C- und N-terminalen homologen Domänen. (EVH1, EVH2 = Ena-VASP-homologe Domäne 1 und 2). Angezeigt werden die Stellen, an denen das Protein von den cAMP- beziehungsweise cGMP-abhängigen Proteinkinasen phosphoryliert wird. S157, S239, T278 (S = Serin, T = Threonin)



**Abbildung 5:**

**Aktivierung des Zielproteins VASP.** Vermehrte Freisetzung von NO beziehungsweise Prostazyklin führt zum Anstieg von cAMP und cGMP, was die Aktivierung einer cAMP- beziehungsweise cGMP-abhängigen Proteinkinase zur Folge hat. Dies führt über die Phosphorylierung des 3rd messengers VASP zu seiner Aktivierung und in der Folge zu unterschiedlichen Effekten, die sich *in vitro* inhibitorisch auf die Thrombozytenfunktion ausüben. Die *in vivo* Funktion ist doch ungeklärt. VASP = vasodilator-stimulated-Phosphorprotein, NO = nitric oxid, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP = Guanosinmonophosphat.

## 2 ZIEL DER STUDIE

Nachdem vieles über die entscheidende Funktion von VASP bei der Regulation der Thrombozytenaktivität, deren Adhäsion, Aktivierung und Aggregation, *in vitro* herausgearbeitet wurde, soll das Ziel dieser Arbeit nun die Untersuchung seiner Rolle *in vivo* sein. Mithilfe eines Tiermodells, der VASP-Knock-out-Maus, soll in verschiedenen Versuchsansätzen die Bedeutung von VASP für die Thrombozytenfunktion *in vivo* genauer untersucht werden. Zusätzlich soll seine Rolle im atherosklerotischen Prozess analysiert werden. Folgende Leitfragen zum Einfluss von VASP auf die Thrombozytenfunktion sollen im weiteren Verlauf geklärt werden:

- (1) Welche Rolle spielt VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion unter *physiologischen Bedingungen*?
- (2) Welche Bedeutung hat P-Selektin und GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion in VASP<sup>-/-</sup>-Tieren unter *physiologischen Bedingungen*?
- (3) Welche Rolle spielt VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen Bedingungen* – nach Ischämie und Reperfusion?
- (4) Welche Rolle spielt VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion nach Endotheldenudation?
- (5) Welche Rolle spielt VASP bei der NO-abhängigen Inhibition der Thrombozytenadhäsion nach Endothelverletzung?
- (6) Welche Rolle spielt VASP bei der Regulation der Thrombozytenadhäsion an die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand?

Diesem Konzept folgend ist die Arbeit in zwei Abschnitte gegliedert:

(1) Einfluss von VASP auf Thrombozytenadhäsion unter *physiologischen* Bedingungen *in vivo*

- Thrombozytenadhäsion in Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Arteria Carotis Communis
- Die Bedeutung von P-Selektin und GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion

(2) Einfluss von VASP auf Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo*

- Nach Ischämie/Reperfusion
- Nach Endotheldenudation durch Gefäßligatur der Arteria Carotis Communis
- Im Rahmen atherosklerotischer Gefäßveränderungen
- Im Rahmen der Atheroprogression – Möglicher Einfluss der gesteigerten Thrombozytenadhäsion bei VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen auf die Atheroprogression

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Vorbemerkungen**

Alle Experimente, die an Tieren ausgeführt wurden, sind gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

##### **3.1.2 Versuchstiere**

VASP-defiziente und VASP<sup>+/+</sup>-Mäuse wurden uns freundlicherweise aus dem Labor von Prof. Walter/Universität Würzburg für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Der VASP-Knockout basiert auf der Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette in das VASP- Gen.<sup>33</sup> Diese macht die korrekte Expression des Gens nicht mehr möglich (*Abb.6*).

Für die Experimente dieser Studie wurden 8- bis 12-Wochen alte männliche VASP<sup>-/-</sup>- und VASP<sup>+/+</sup>-Mäuse (Wildtyp) mit C57BL/6/129sv-Hintergrund verwendet.

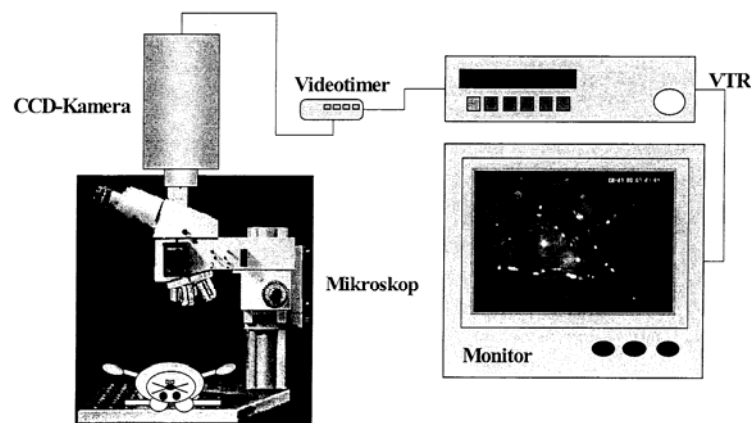
Um die Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>- und Wildtypthrombozyten an atherosklerotisch veränderten Endothel beurteilen zu können, setzten wir kommerziell erhältliche ApoE<sup>-/-</sup> (C57BL/6J-ApoE<sup>tm1Unc</sup>)-Mäuse ein (Jackson-Labor/Bar Harbor, Maine, USA). Diese Tiere wurden ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 6 Wochen mit einer 0,25% Cholesterindiät (Harlan Research Diät, 0% Cholat) gefüttert.

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 In vivo Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.2.1.1 Technisches Setup

Die Analyse der Thrombozytenfunktion *in vivo* erfolgte mit Hilfe der intravitralen Videofluoreszenzmikroskopie an jeweils 6 Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppe. Hierzu stellten wir den Blutfluss in der Arteria Carotis Communis (ACC) beziehungsweise in der Mikrostrombahn des Dünndarms mittels Epiilluminationstechnik an einem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskops (Axiotechvario 100HD, Fa. Zeiss, Göttingen) dar. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe (HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen), die ein für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff (2,7-Dichlordihydrofluorszein-Diacetat, Fa. Molecular Probes, USA) entsprechenden Filtersatz aufwies (Abb.6). Alle Untersuchungen wurden mit einer charge-coupled device Kamera (CCD) (FK 90-IQ-S, Fa. Pieper, Düsseldorf) und einer Video-Monitor-Einheit (Videogerät: Panasonic AG-7355, Fa. Videocation, München; Monitor: Sony PVM-20M7MDE, Fa. Videocation, München) zur späteren Auswertung aufgezeichnet.



**Abbildung 6:**

*Schematischer Aufbau des IVM-Arbeitsplatzes. Links: Die präparierte Maus liegt unter dem Fluoreszenzmikroskop; Die emittierten fluoreszierenden Strahlen werden von der CCD-Kamera aufgenommen und über einen Videotimer an den Videorekorder weitergegeben. Rechts: Einheit zur Auswertung: Videorekorder und Monitor.*

### 3.2.1.2 Narkose

Für die Präparation der Versuchstiere zur Intravitalmikroskopie wurde die Narkose mit Inhalation von Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott) (Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen) und Sauerstoff eingeleitet und durch intraperitoneale Injektion einer Kombinationsanästhesie aus Medetomidin (0,5 mg/kg, Fa. Pfizer), Midazolam (5mg/kg, Fa. Ratiopharm) und Fentanyl (0,05 mg/kg, Fa. CuraMed Pharma GmbH) aufrechterhalten.<sup>35</sup> Während der gesamten Operation wurde dem Versuchstier zur besseren Oxygenierung Sauerstoff über eine Nasenmaske zugeführt.

### 3.2.1.3 Thrombozytenpräparation

Die Isolation der Thrombozyten wurde nach einer durch die Arbeitsgruppe erarbeiteten Methode durchgeführt. Das Spendertier wurde, wie unter 3.2.1.2 aufgeführt, anästhesiert. Darauf wurde kardial punktiert und ca. 1,5 bis 2 ml Blut pro Tier gewonnen. Das entnommene Blut wurde mit Citrat (100µl Citrat/1ml Blut) ungerinnbar gemacht und mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5; Zusammensetzung siehe unter 3.3.1) auf ein Volumen von 2,5ml aufgefüllt. Das Blut-Tyrodes-Gemisch wurde bei 800 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (Haereus, Megafuge, Hanau). Das hierbei durch Auftrennung entstandene so genannte plättchenreiche Plasma (PRP) wurde anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat, Fa. Molecular Probes, USA) für die *ex vivo*-Markierung der Thrombozyten versetzt (20µl/PRP einer Maus) und wiederum mit Tyrode pH 6,5 auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Das PRP wurde nach Inkubation mit dem Farbstoff im Dunkeln bei 2400rpm für 10 Minuten nochmals zentrifugiert. Das hierbei entstandene Thrombozyten-Pellet wurde in jeweils gleichen Anteilen von Tyrode pH 6,5 (250µl) und pH 7,4 (250µl) resuspendiert, um den Thrombozyten ein möglichst physiologisches Milieu zu bieten. In früheren Untersuchungen konnte eine nennenswerte Thrombozytenaktivierung nach diesem Protokoll ausgeschlossen werden.<sup>25</sup> Die Thrombozytenzahl wurde mit Tyrodes auf eine Konzentration von 200.000/µl eingestellt. Von dieser Thrombozytensuspension erhielt jedes Empfängertier 250 µl. Somit konnte gewährleistet werden, dass jedes Tier  $50 \times 10^6$  Thrombozyten in 250µl erhielt und damit die Ausgangsbedingungen

für alle Mäuse gleich waren. Das Auszählen der Thrombozyten erfolgte maschinell (Sysmex Microcellcouter F-800, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt).

#### 3.2.1.4 *Präparation des Empfängertieres*

Die Thrombozytenfunktion wurde in der Arteria Carotis Communis (ACC) und der Mikrozirkulation des Dünndarms untersucht. Die Tiere wurden nach der unter 3.2.1.2 beschriebenen Methode anästhesiert und nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe in Rückenlage auf einer Wärmematte (Fa. Dehner, München) fixiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter einem Präpariermikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss, Göttingen). Es wurde ein medianer Halsschnitt angelegt und bis zur Vena jugularis dextra in die Tiefe präpariert. Als Zugang für die Applikation der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten wurde ein Katheter (SIMS Portex, Hythe, England) in die Vena jugularis dextra gelegt. Für die Analyse der Thrombozytenadhäsion in der ACC wurde die rechte ACC von proximal (herznah) bis nach distal der Bifurkation in Arteria Carotis Externa und Interna freipräpariert. Für die Analyse der Thrombozytenadhäsion in der Mikrostrombahn des Dünndarms wurde bei 4-6 Wochen alten Tiere des jeweiligen Genotyps (n=5-9) eine transversale Laparotomie durchgeführt und ein Jejunumsegment freigelegt.<sup>52</sup>

#### 3.2.1.5 *Mikroskopierschema*

Die Aufzeichnung der Thrombozytenadhäsion erfolgte in der ACC und in den submukosalen Mikrogefäßen des Dünndarms.

Bei 20-facher Vergrößerung konnten die Thrombozyten im Fluss der ACC dargestellt werden. Es wurden vier sich nicht überlappende Regionen der ACC auf Höhe der Bifurkation für 30 Sekunden auf Video aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden über die CCD-Kamera in das Video-Monitorsystem zur späteren Auswertung weitergegeben.

Im Bereich der Mikrozirkulation des Dünndarms wurden 10 sich nicht überlappende Regionen der submukosalen Gefäße des freipräparierten Jejunumsegments per Zufall ausgewählt und über eine Sequenz von 30 Sekunden aufgezeichnet. Die mikroskopischen Bilder mit einer Endvergrößerung von 450x wurden mithilfe der CCD-Kamera in das Video-Monitor-System eingespeist.

### 3.2.1.6 Auswertung der Videoaufnahmen

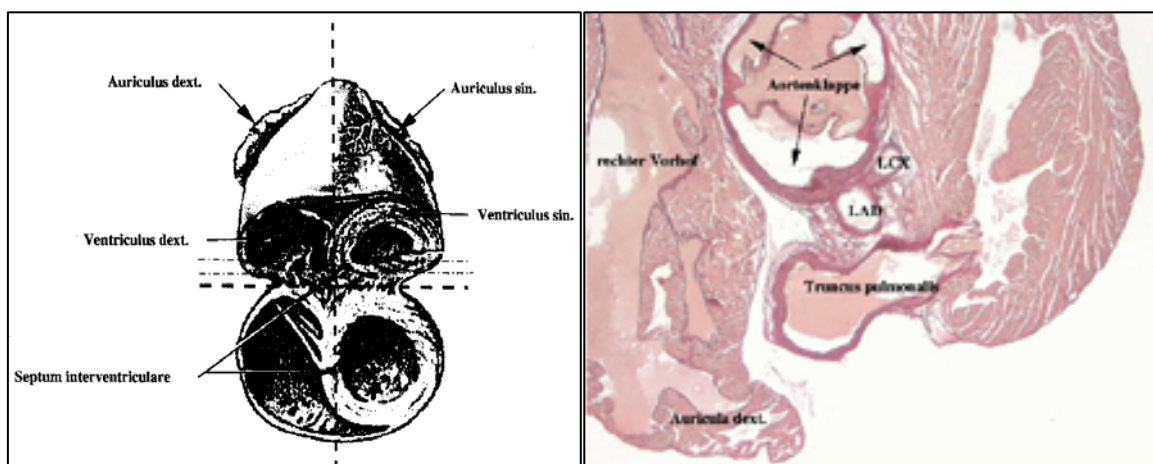
Die Auswertung der Videoaufnahmen erfolgte im „Bild-zu-Bild“-Verfahren, bei dem alle Bilder nacheinander beurteilt und die transient adhären und fest adhären Zellen einzeln ausgezählt wurden. Als „transient adhären“ wurde eine Zelle definiert, die langsamer als der Hauptstrom floss, mehr als fünf Einzelbilder an der gleichen Stelle haften, aber kürzer als 15 Sekunden in dieser Position blieb. Wenn Zellen länger als 15 Sekunden am gleichen Punkt der Endotheloberfläche hängen blieben, wurden sie als „fest adhären“ bezeichnet. Die ausgezählten Zellen wurden anschließend in eine Tabelle (Microsoft Office 2000, Excel) eingetragen und in Diagrammen zusammengefasst.

### 3.2.2 Histomorphometrie

Für die Quantifizierung der Mediaproliferation in den pathologisch veränderten Gefäßen, wurden jeweils 6 Wildtypmäuse und 6 VASP<sup>-/-</sup>-Mäuse im Alter von 10 Wochen durch Entbluten geopfert. Die Tiere hatten zuvor eine 6-wöchige cholesterinreiche Diät erhalten. Die Herzen wurden nach einem standardisierten Protokoll mit erhaltenem Aortenstumpf herauspräpariert und nochmals in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Zusammensetzung unter 3.3.2) für 24 Stunden fixiert. Daraufhin wurden 4 mm der Herzspitze senkrecht zur Herzachse mit dem Skalpell abgetrennt (*Abb.7 links*). Beide Herzteile wurden 24 Stunden in einem geschlossenen Gewebeerwässerungsautomaten (PC 1044-12V, Fa. Shandon, Frankfurt) entwässert und paraffinfixiert. Der jeweils proximale Herzabschnitt wurde in Paraffinblöcke (TBS 88, Fa. Medite, Burgdorf) eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms (HM 335E, Fa. Microm, Waldorf) fertigten wir Serienquerschnitte des Herzens von distal nach proximal an und sammelten jeweils immer zwei Schnitte auf einem Objektträger (Micro Slides, Fa. Brand, Wertheim). Die Schnitte wurden in einem Färbeautomat (TST 50, Fa. Medite, Brugdorf) mit Elastica van Giesson gefärbt und mit Deckgläsern (Deckglas 24x50mm, Fa. Medite, Burgdorf) in einem Objektträger-Eindeckautomat (RCM 2000, Fa. Medite, Burgdorf) abgedeckt. Um bei allen Herzen von standardisierten Stellen ausgehen zu können, wählten wir als Ausgangspunkt für unsere Serienschnitte den Abgang der Koronararterien aus dem Aortensinus einige Millimeter oberhalb der Aortenklappe



(Abb.7 rechts). Von 60 sequentiellen Schnitten á 2 µm Dicke, von denen 30 oberhalb und 30 unterhalb besagter Stelle stammten, wurden zur Auswertung jeder 3. Schnitt (insgesamt 20 Schnitte) verwendet. Jeder dieser Schnitte, auf dem Aorta und Koronararterien sichtbar waren, wurde an einem Mikroskop (Leica-DMRB, Fa.Leica, Bensheim) bei 10facher Vergrößerung mit einer digitalen Kamera (Axiovision, Fa.Zeiss, Göttingen) abphotographiert und mithilfe des Bildanalyisierungsprogramm (Cap image 7,4, Dr.Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. Die Werte wurden in Tabellen (Microsoft Office 2000, Excel) eingetragen.



**Abbildung 7:**

*Makroskopischer (links) und mikroskopischer (rechts) Querschnitt durch das Herz. Übersicht über die einzelnen anatomischen Strukturen. Links: rechtes und linkes Herzohr sind zu sehen sowie der rechte und linke Ventrikel mit dazwischenliegendem Septum. Des Weiteren ist die Herzachse eingezeichnet, an der wir unsere Serienquerschnitte orientiert haben Rechts: Schnitt bei 10facher Vergrößerung durch den Aortenursprung mit sichtbaren Taschenklappen und abzweigenden Koronararterien (LAD = „left anterior descendent“, LCX = „left circumflexus“, beide Äste der linken Koronararterie). Ebenfalls zu sehen sind der rechte Vorhof und der Truncus pulmonalis.*

### 3.3 VERWENDETE REAGENZIEN

#### 3.3.1 Tyrode-Puffer

- 0,4g Bovines Serumalbumin (A-8022, SIGMA Chemical, Steinheim)
- 0,4g D(+)-Glukose (G-8270, SIGMA Chemical, Steinheim)

wurde in 40 ml Tyrodes 10x gelöst, mit Aqua dest. auf 400 ml aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 6,5 bzw. 7,4 eingestellt.

#### 3.3.2 Paraformaldehyd

Zur Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd wurden 40 g Paraformaldehyd zu 900 ml Aqua dest. gegeben, 320µl NaOH (10N) hinzugefügt und bei 65°C im Wasserbad angerührt bis nach 30 Min. die Lösung klar wurde. Schließlich wurde 100 ml PBS hinzugegeben und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 3.4 ARBEITSPROGRAMM

#### 3.4.1 Einfluss von VASP auf die Thrombozytenadhäsion unter physiologischen Bedingungen *in vivo*

##### 3.4.1.1 Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen in Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen

VASP<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Empfängermäusen (n=6), die nach unter 3.2.1.2 beschriebener Methode anästhesiert wurden, wurden fluoreszenzmarkierte Thrombozyten ( $2 \times 10^6 / 250 \mu\text{l}$ ) intravenös über den Katheter in die Vena jugularis injiziert. Die Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen wurden *in situ* mithilfe des beschriebenen intravitalmikroskopischen Mikroskopierschemas der freipräparierten ACC dargestellt. Die Aufnahmen wurden für die spätere Analyse aufgezeichnet (siehe 3.2.1.5). Alle Videoaufnahmen werteten wir mit der entsprechenden Bildanalysesoftware (Cap image 7.1, Dr.Zeintl, Heidelberg, Deutschland) und dem unter 3.2.1.6 erwähnten Bild-zu-Bildverfahren aus.

### 3.4.1.2 Bedeutung von P-Selektin und GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Um den Einfluss von P-Selektin und GPIIb-IIIa auf das Adhäsionsverhalten von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen herauszuarbeiten, injizierten wir in zwei separaten Ansätzen fluoreszenzmarkierte VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zusammen mit blockierenden monoklonalen Antikörpern (mAb) (50 µg anti-GPIIb-IIIa (JON/A-F(ab)2)<sup>71</sup> und anti-P-Selektin (Pharmigen, Hamburg)) in VASP<sup>-/-</sup>-Empfängertiere. Daraufhin wurde erneut das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten in der ACC (n=6-7) unter Zuhilfenahme der oben bereits beschriebenen Intravitalmikroskopie analysiert.

### 3.4.2 Einfluss von VASP auf die Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo*

Die Bedeutung von VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo* wurde in drei unterschiedlichen Ansätzen analysiert.

- (1) Nach Ischämie und Reperfusion
- (2) Nach Endotheldenudation
- (3) Im Rahmen der initialen Atherosklerose

Auf die einzelnen Versuchsansätze soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

#### 3.4.2.1 Thrombozytenadhäsion nach Reaktion auf Ischämie und Reperfusion

Um die biologische Bedeutung von VASP bei der Regulation der Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo* weiter zu verfolgen, beurteilten wir die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen vor und nach intestinaler Ischämie mit nachfolgender Reperfusion (I/R). Die Methode wurde bereits 1999 beschrieben.<sup>54</sup> C57BL/6/129sv Mäuse des jeweiligen Genotyps (n=8) wurden nach unter 3.2.1.2 be-

schriebener Methode anästhesiert und laparotomiert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde ein Jejunumsegment freigelegt und konstant mit 37°C Ringerlaktat-Lösung superfundiert. Mit mikrochirurgischen Klips wurden die das Segment versorgenden Gefäße für 60 Minuten okkludiert. Durch Entfernen der Klips erfolgte die Reperfusion. Nach Infusion fluoreszenzmarkierter Thrombozyten über den Jugulariskatheter wurden die Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen im Mikrogefäßsystem des Dünndarms vor Induktion der Ischämie, sowie nach Ischämie (60 Minuten) mit anschließender Reperfusion (15 Minuten nach Entfernen der Klips) mithilfe der unter 3.2.1.5 und 3.2.1.6 beschriebener Methode analysiert. Untersucht wurde die Adhäsion von Thrombozyten in Arteriolen und Venolen (Gefäßdurchmesser von 15µm bis 85µm) der Submukosa des Dünndarms. Die mikroskopischen Bilder wurden im Videosystem aufgezeichnet und im Bild-zu-Bild-Verfahren ausgewertet. Die Thrombozytenadhäsion wurde in pro Quadratmillimeter der endothelialen Oberfläche angegeben.

#### 3.4.2.2 Thrombozytenadhäsion nach Gefäßverletzung – Effekt von NO

In einem nächsten Schritt untersuchten wir das Adhäsionsverhalten von Wildtyp- beziehungsweise VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Verletzung eines Gefäßes. In dem gleichen Ansatz definierten wir zusätzlich die Bedeutung von VASP für die NO-vermittelte Inhibition der Thrombozytenadhäsion nach Gefäßverletzung *in vivo*. Wildtypmäuse wurden nach unter 3.2.1.2 genanntem Narkoseschema anästhesiert und nach unter 3.2.1.4 dargestellter Methode präpariert. Die rechte ACC wurde freigelegt und nahe der Karotisbifurkation für 5 Minuten mit einem Faden (Prolene<sup>®</sup>, 7,0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) ligiert. Anschließend wurde die Ligatur wieder entfernt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Vorgehen zu einer standardisierten Endotheldenudation führt. DCF-markierte Wildtyp bzw. VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten (50x10<sup>6</sup>/ 250µl) wurden bei Raumtemperatur 5 Minuten jeweils entweder mit PBS (PAN System, Aidenbach, Deutschland) oder dem NO-Donoren Spermine-NO (Alexis, Grünberg, Deutschland; 100 nM Endkonzentration) vorinkubiert und anschließend mit 0,2 U/ml Mausthrombin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) für weitere 5 Minuten stimuliert. Die gewählte Konzentration des Mausthrombins bewirkt *in vitro* keine vollständige Aggregation der Thrombozyten. Throm-

bin-defiziente Thrombozyten wurden verwendet, da VASP an der Thrombin-induzierten Affinitätsmodulation des GPIIb-IIIa auf Thrombozyten beteiligt ist.<sup>3,33</sup> Zusätzlich weiß man, dass NO, das die VASP-Phosphorylierung triggert, die thrombininduzierte Integri-naktivierung auf Thrombozyten vermindert.<sup>61</sup>

Nach der Aktivierung durch Thrombin wurden nun die fluoreszenzmarkierten Thrombozyten in den Jugulariskatheter injiziert. Die Thrombozytenadhäsion an das verletzte Endothel stellten wir *in situ* nach der unter 3.2.1.5 und 3.2.1.6 beschriebenen Methode fluoreszenzmikroskopisch dar.

#### 3.4.2.3 Bedeutung von GPIIb-IIIa für die Thrombozytenadhäsion nach Endothel-denudation

In wiederum separaten Experimentansätzen untersuchten wir die Rolle des thrombozytären Fibrinogenrezeptors bei der Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach endothelialer Denudation. Fluoreszenzmarkierte VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden für 10 Minuten mit 50µg/ml anti-GPIIb-IIIa (JON/A-F(ab)<sub>2</sub>)<sup>71</sup> oder PBS vorinkubiert. Die ACC der Wildtypmäuse wurde, wie bereits beschrieben, für fünf Minuten ligiert, um das Endothel zu schädigen. Daraufhin wurden die mit Antikörper bzw. PBS vorinkubierten VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten den Tieren verabreicht und an der Stelle der Läsion innerhalb der ACC (n=4-5) mithilfe der Intravitalmikroskopie dargestellt und quantifiziert.

#### 3.4.2.4 Beurteilung der Thrombozytenadhäsion in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

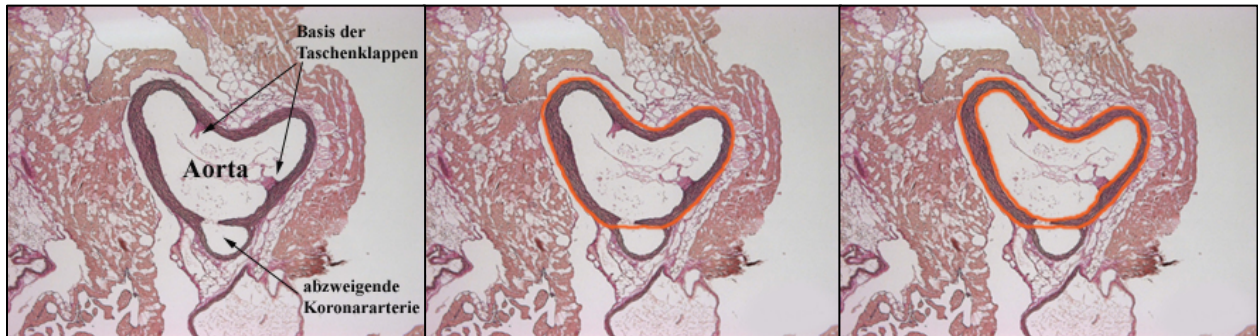
Um die Rolle von VASP bei der Regulation der Thrombozytenadhäsion an die bereits atherosklerotisch veränderte Gefäßwand näher zu definieren, infundierten wir DCF-markierte Thrombozyten des jeweiligen Genotyps (Wildtyp und VASP<sup>-/-</sup>) intravenös in 10 Wochen alte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse. Diese waren zuvor über einen Zeitraum von 6 Wochen mit einer Cholesterindiät gefüttert worden. Man weiß, dass dies zu frühen atherosklerotischen Gefäßveränderungen im Sinne einer endothelialen Dysfunktion führt.<sup>56</sup> Die Thrombozytenadhäsion in der rechten ACC wurde erneut *in situ* mithilfe der Intravitalmikroskopie analysiert.

#### 3.4.2.5 Bedeutung von VASP für das vaskuläre Remodeling

Im letzten Abschnitt untersuchten wir die Bedeutung von VASP für das vaskuläre Remodeling. 10 Wochen alte Tieren beider Genotypen (VASP<sup>+/+</sup> und VASP<sup>-/-</sup>; n=6) erhielten ab einem Alter von 4 Wochen eine sechswöchige Cholesterindiät. Es ist bereits bekannt, dass cholesterinreiche Nahrung bei *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen aber auch bei C57BL6 Tieren zu frühen atherosklerotischen Veränderungen und endothelialer Dysfunktion führt.<sup>56</sup> In diesem Versuchsansatz sollte der mikroskopisch sichtbare Effekt eines hohen Cholesterinspiegels auf die Gefäßwand bei VASP<sup>-/-</sup>- und VASP<sup>+/+</sup>-Mäusen deutlich gemacht werden. Es sollte gezeigt werden, inwieweit die bei VASP-Nullmutanten gesteigerte Thrombozytenadhäsion mit einer gesteigerten Entwicklung atherosklerotischer Läsionen einhergeht. Im Anschluss an die Cholesterindiät wurden die Versuchstiere geopfert. Die Herzen mit angeschlossenen Aortenstumpf wurden entnommen. Wir fertigten histologische Serienquerschnitte des Aortensinus nach unter 3.2.2 beschriebener Methode an.

Für die Quantifizierung der Mediasklerose beider Genotypen (Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Mäuse) untersuchten wir bei 20facher Vergrößerung jeden dritten der 60 sequentiellen Schnitte von 2µm Dicke. Der relevante Gefäßabschnitt befand sich auf Höhe der Klappen-ebene im Aortenursprung. Die Bilder wurden mit dem Bildanalytischen Programm histomorphometrisch evaluiert. Dabei folgten wir folgendem Schema (*Abb.8*):

1. Messung der Gesamtfläche des Gefäßes (Fläche innerhalb der Membrana elastica externa);
2. Messung der Fläche der Media (Fläche zwischen Membrana elastica interna und externa) (*Abb.8*);
3. Berechnung des Verhältnisses der beiden Flächen (Fläche der Media/Gesamtfläche des Gefäßes);
4. Berechnung des prozentualen Anteils der Fläche der Media an der Gesamtgefäßfläche. Durch die Berechnung der Verhältnisse konnten eventuelle Schwankungen in der Gefäßgröße ausgeglichen werden. Die Berechnung erfolgte unter Zuhilfenahme von Excel (Microsoft Office 2000, Excel).



**Abbildung 8:**

*Schematische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung. Alle Bilder zeigen einen Elastica van Giesson gefärbten Querschnitt in 20facher Vergrößerung durch den Aortenursprung einer VASP<sup>-/-</sup>-Maus. Im mittleren Bild wird die Gesamtgefäßfläche dargestellt. Im rechten Bild ist die von der Membrana elastica externa und interna begrenzte Mediafläche dargestellt.*

### 3.5 STATISTISCHE ANALYSEN

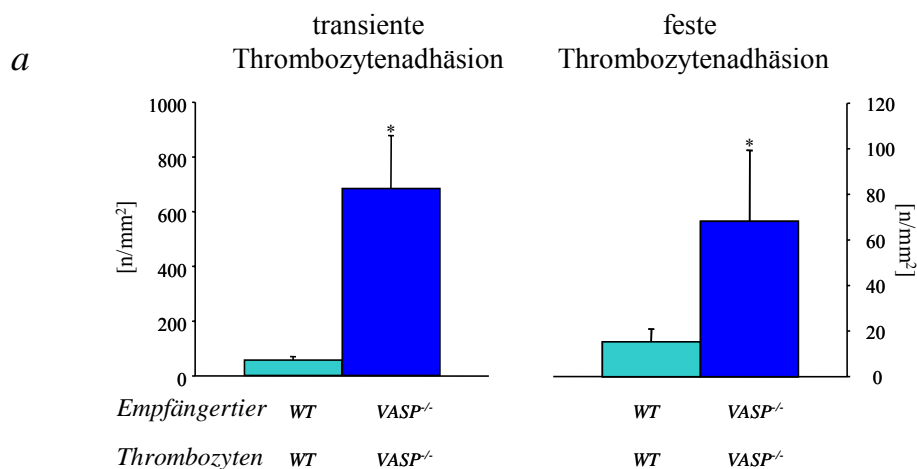
Für den Vergleich von VASP<sup>+/+</sup>- und VASP<sup>-/-</sup>-Tieren verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit den Mann-Whitney Rangsummentest. Alle Daten sind im Text als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler angegeben. Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Statistikprogramm Sigma Stat Version for Windows 2.0.

## 4 ERGEBNISSE

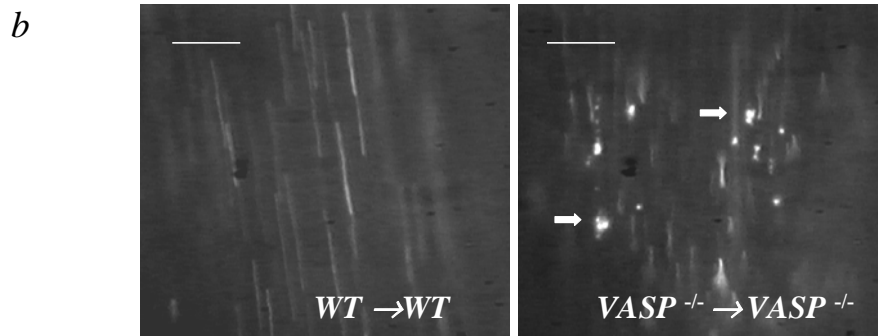
### 4.1 VASP REGULIERT DIE THROMBOZYTENADHÄSION UNTER *PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IN VIVO*

#### 4.1.1 Verstärkte Thrombozyten-Endothelzellinteraktion in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen

Um die Bedeutung von VASP im Bezug auf das hämostatische Gleichgewicht der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion *in vivo* deutlich zu machen, untersuchten wir die Thrombozytenadhäsion in der ACC von VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Fluoreszenzmarkierte VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden in VASP<sup>-/-</sup>-Mäuse injiziert und mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie analysiert. Wildtypthrombozyten, die in Wildtypempfängertieren injiziert wurden, dienten als Kontrolle. Während Wildtypthrombozyten unter *physiologischen* Bedingungen nicht mit dem Wildtypendothel interagierten, war die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei VASP-defizienten Mäusen *in vivo* signifikant verstärkt (Abb.9a,b). Die transiente Adhäsion der Thrombozyten an die endotheliale Oberfläche der VASP<sup>-/-</sup>-Mäuse nahm im Vergleich zu den Wildtyptieren nahezu um den Faktor 11 zu. Die Zahl der fest an der Gefäßwand adhärenen Thrombozyten wurde ebenfalls um den Faktor 4 gesteigert ( $p < 0,05$ ).







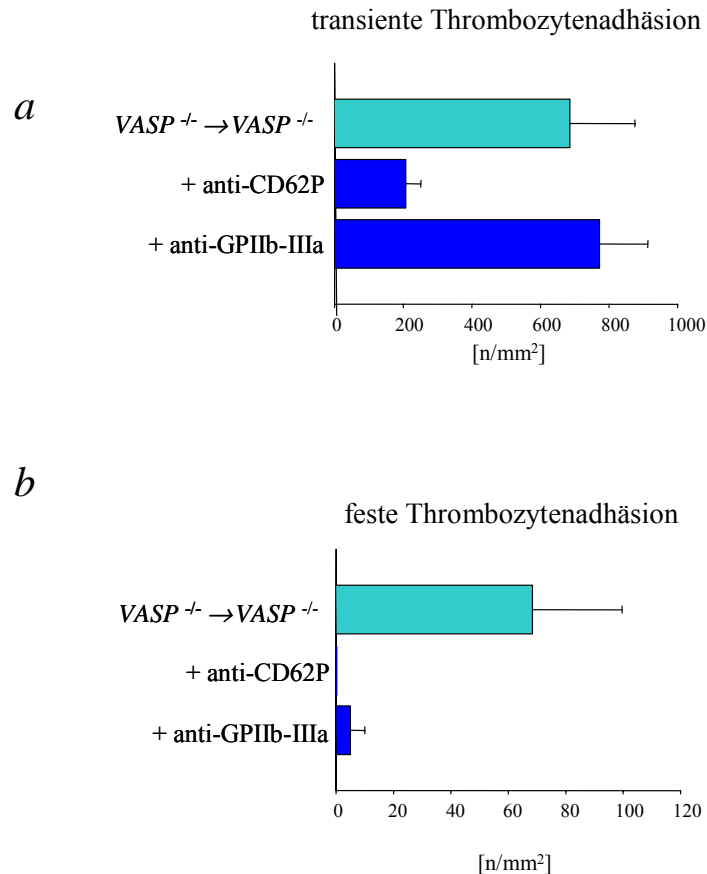
**Abbildung 9:**

*Die Rolle von VASP bei der Regulation der Thrombozytenadhäsion in der ACC in vivo. (a) Die Untersuchung der Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen erfolgte in situ durch intravitalmikroskopische Aufnahmen innerhalb der ACC. Wildtypiere dienten als Kontrolle. Links ist die transiente, rechts die feste Thrombozytenadhäsion dargestellt. Je nach Interaktionsverhalten mit dem Endothel (siehe Methodenteil) wurden die Thrombozyten in transient adhärenente und fest gebundene eingeteilt und in pro mm<sup>2</sup> Gefäßoberfläche angegeben. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n=8-10 jeder Gruppe. \*: p < 0,05 vs. Wildtypiere (b) Die Bilder repräsentieren intravitalmikroskopische Aufnahmen. Die weißen Pfeile deuten auf adhärenente Thrombozyten. Die Balken entsprechen 50  $\mu$ m.*

#### **4.1.2 P-Selektin und GPIIb-IIIa vermitteln die transiente und feste Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten**

Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass VASP an der negativen Regulation der P-Selektin-Oberflächenexpression und an der Hemmung der agonisteninduzierten GPIIb-IIIa Affinitätsmodulation beteiligt ist<sup>33</sup>, untersuchten wir in einem nächsten Schritt die Bedeutung von P-Selektin und GPIIb-IIIa für die verstärkte Thrombozytenadhäsion unter *physiologischen* Bedingungen in VASP<sup>-/-</sup>-Mutanten. VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden 50 $\mu$ g eines blockierenden monoklonalen anti-P-Selektin bzw. anti-GPIIb-IIIa-Antikörpers verabreicht. Anschließend wurde das Adhäsionsverhalten in der ACC intravitalmikroskopisch dargestellt. Durch die anti-P-Selektin-Antikörper-Applikation wurde die transiente Adhäsion um nahezu 70% reduziert und die feste Thrombozytenadhäsion in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen vollständig aufgehoben (p < 0,05). Im Gegensatz dazu hatte der anti-GPIIb-IIIa-Antikörper keinen Effekt auf die transiente Thrombozytenadhäsion, reduzierte jedoch die feste Thrombozytenadhäsion in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich (p < 0,05) (Abb. 10a,b). Zusammengenommen zeigt

dies, dass P-Selektin die gesteigerte transiente Thrombozytenadhäsion in  $VASP^{-/-}$ -Tieren mediiert, während die feste Thrombozytenadhäsion durch thrombozytäres GPIIb-IIIa vermittelt wird.



**Abbildung 10:**

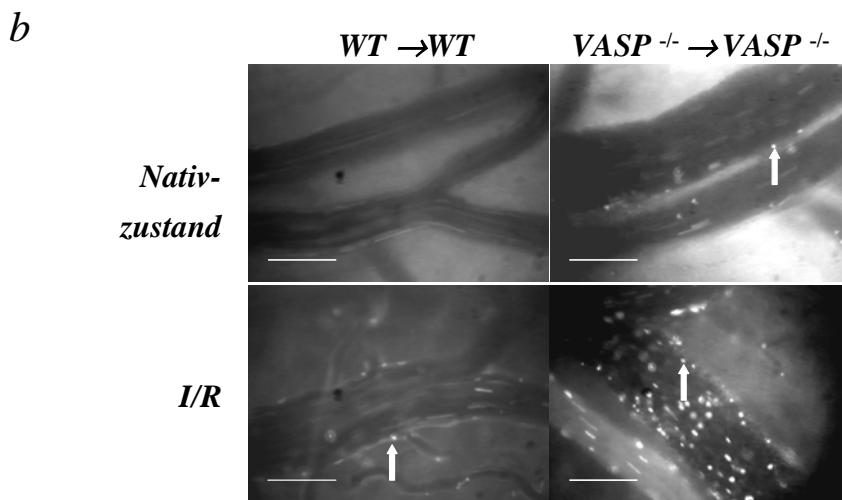
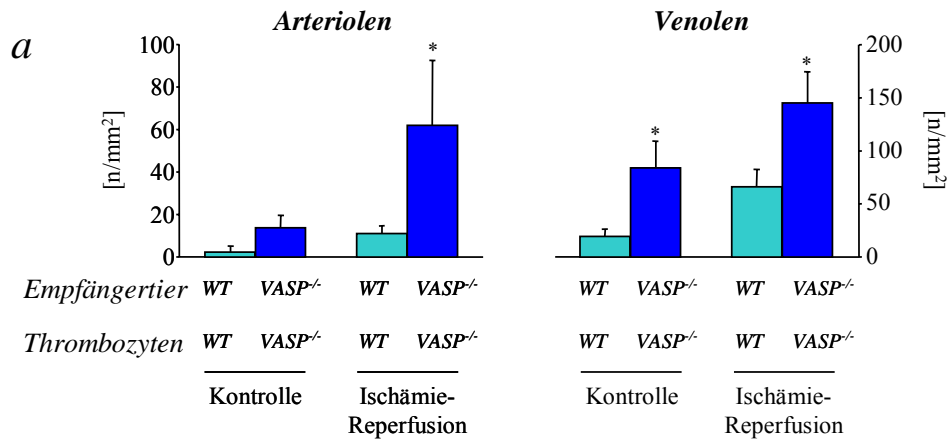
*Die Bedeutung von P-Selektin und GPIIb-IIIa für die transiente Thrombozytenadhäsion (a) und feste Thrombozytenadhäsion (b) in  $VASP^{-/-}$ -Mäusen. Vor der Intravitalmikroskopie wurden den  $VASP^{-/-}$ -Mäusen 50 $\mu$ g blockierender anti-P-Selektin bzw. anti-GPIIb-IIIa mAK injiziert. Unbehandelte  $VASP^{-/-}$ -Mäuse dienten als Kontrolle. Je nach Interaktionsverhalten mit dem Endothel (siehe Methodenteil) wurden die Thrombozyten in transient und fest adhärenente Thrombozyten eingeteilt und in pro mm<sup>2</sup> der Gefäßoberfläche angegeben. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=6-7 Karotiden.  $p < 0,05$  vs. un behandelter  $VASP^{-/-}$ -Mäuse.*

## 4.2 VASP REGULIERT DIE THROMBOZYTENADHÄSION UNTER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IN VIVO

### 4.2.1 VASP reguliert die Thrombozytenadhäsion an das postischämisch veränderte Endothel von Mikrogefäßen

Interaktionen zwischen zirkulierenden Thrombozyten und der Gefäßwand sind Voraussetzung für die Erhaltung der Gefäßintegrität und der vaskulären Homöostase. In bestimmten pathophysiologischen Prozessen, zum Beispiel im Rahmen von Ischämie und Reperfusion, kann die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten jedoch auch zum Integritätsverlust des Gefäßes beitragen.<sup>20,88</sup> Um die Bedeutung von VASP bei der Regulation der Thrombozyten-Gefäßinteraktionen unter *pathophysiologischen* Bedingungen *in vivo* herauszuarbeiten, stellten wir die Thrombozytenadhäsion innerhalb der Mikrozirkulation eines ischämischen und anschließend reperfundierten Jejunumsegments dar. Dazu wurde ein Dünndarmsegment von Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Tieren einer segmentalen Ischämie unterzogen und nach 60 Minuten wieder reperfundiert. Die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen innerhalb der intestinalen Arteriolen und Venolen dieses Segments stellten wir mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zunächst vor dem ischämischen Zustand, sowie nach Ischämie und Reperfusion dar. Ohne Ischämie und Reperfusion zeigte sich keine Interaktion zwischen Wildtypthrombozyten und Wildtypendothel ( $6 \pm 4$  und  $26 \pm 8$  fest adhärenente Thrombozyten/mm<sup>2</sup> jeweils in Arteriolen und Venolen) (*Abb.11a,b*). Dagegen waren, wie oben bereits für die Makrogefäße (ACC) beschrieben, zahlreiche fest adhärenente VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten am Gefäßendothel von intestinalen Mikrogefäßen in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen zu finden ( $14 \pm 6$  und  $85 \pm 25$  fest adhärenente Thrombozyten/mm<sup>2</sup> jeweils in Arteriolen und Venolen;  $p < 0,05$  vs. Wildtyp). Nach Ischämie und Reperfusion waren  $11 \pm 3$  und  $67 \pm 16$  fest adhärenente Thrombozyten/mm<sup>2</sup> jeweils in Arteriolen und Venolen von Wildtypmäusen zu finden (*Abb.11a,b*). Der Verlust von VASP steigerte die postischämische Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen signifikant. Sowohl innerhalb der Arteriolen als auch Venolen stieg die Zahl der adhärenenten Thrombozyten um den Faktor 2 bis 5 im Vergleich zu den Wildtyptieren ( $62 \pm 30$  und  $146 \pm 29$  fest adhärenente Thrombozyten/mm<sup>2</sup> jeweils in Arteriolen und Venolen) (*Abb.11a,b*).

Daraus ist zu schließen, dass VASP an der Regulation der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktion von Makro- und Mikrogefäßen sowohl unter *physiologischen* als auch unter *pathophysiologischen* Bedingungen der Ischämie und Reperfusion beteiligt ist.



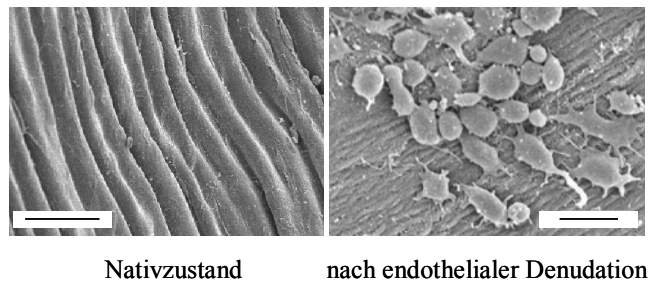
**Abbildung 11:**

Die Bedeutung von VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion unter pathophysiologischen Bedingungen *in vivo*. (a) Die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen wurden vor und nach intestinaler Ischämie sowie nach Reperfusion (I/R) wie beschrieben untersucht. Mithilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie konnten die Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen im intestinalen Mikrogefäßsystem (Arteriolen links, Venolen rechts) vor (Kontrolle) und nach Ischämie und Reperfusion untersucht werden.<sup>53,54</sup> Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*:  $p < 0,05$  vs. Wildtypen. (b) Die Bilder repräsentieren fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion vor (oben) und nach intestinaler Ischämie und Reperfusion (unten) in Kontrolltieren (links) und VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen (rechts). Die weißen Pfeile deuten auf adhärenente Thrombozyten. Die Balken entsprechen 50 $\mu$ m.

#### 4.2.2 VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten zeigen vermehrte Adhäsion nach endothelialer Denudation

Bei fortgeschrittener Atherosklerose führt das Einreißen oder die Ruptur der atherosklerotischen Läsion zur Exposition der thrombogenen subendothelialen Matrix und zu deren Kontakt mit zirkulierenden Thrombozyten. Folge ist, dass vermehrt Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand akkumulieren. Um herauszufinden, ob VASP neben dem Einfluss auf die Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen auch an der Regulation der Thrombozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix beteiligt ist, untersuchten wir die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen an der ACC nach Endotheldenudation. Dies erfolgte durch Ligieren der ACC für 5 Minuten, was in der Folge zu einem kompletten Verlust der Endothelzellschicht führte. Dies triggerte lokal die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, was elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnte (*Abb.12*). Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersuchten wir die Adhäsion thrombinaktivierter (0,2 U/ml) Wildtyp- bzw. VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten an die ACC nach Endotheldenudation.

Innerhalb der ersten Minuten nach Freilegung der subendothelialen Matrix interagierten zahlreiche Wildtypthrombozyten transient mit der Gefäßwand ( $2530 \pm 82$  Thrombozyten/mm<sup>2</sup>) (*Abb.14 a-c*). Nahezu alle Wildtypthrombozyten, die mit der subendothelialen Matrix Kontakt aufnahmen, zeigten in der Folge eine irreversible stabile Bindung ( $2089 \pm 28$  Thrombozyten/mm<sup>2</sup>) (*Abb.14 a-c*). Der Verlust von VASP in Thrombozyten führte zu einer signifikant höheren Anzahl transient adhärenter Thrombozyten ( $3191 \pm 144$  Thrombozyten/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$  vs. Wildtypthrombozyten) und zu vermehrter fester Thrombozytenadhäsion im Vergleich zu Wildtypthrombozyten ( $2753 \pm 128$  Thrombozyten/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$  vs. Wildtypthrombozyten). Somit ist VASP an der Regulation sowohl der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion als auch an der Interaktion zwischen Thrombozyten und der subendothelialen Matrix beteiligt.



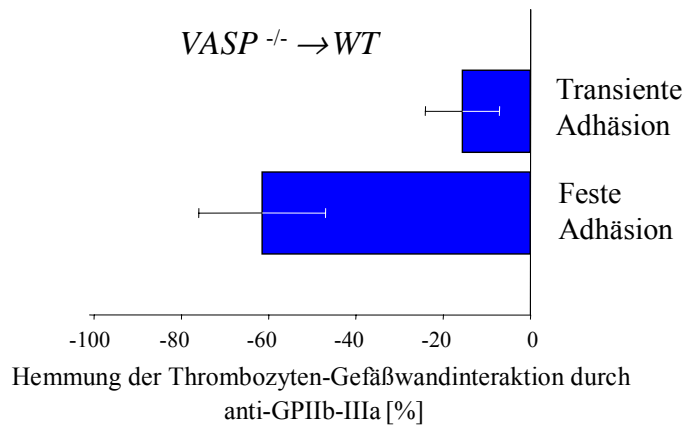
**Abbildung 12:**

*Thrombozytenadhäsion nach endothelialer Denudation. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Karotiden vor (linkes Bild) und nach endothelialer Denudation (rechtes Bild). Endotheliale Denudation fördert die Thrombozytenadhäsion. Die Balken entsprechen 5µm.*

#### **4.2.3 GPIIb-IIIa vermittelt die Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten an die subendotheliale Matrix.**

GPIIb-IIIa vermittelt, wie bereits gezeigt, die Thrombozytenadhäsion an das intakte Endothel in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen. In einem weiteren Ansatz untersuchten wir nun die Bedeutung von GPIIb-IIIa für die Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Wildtyptiere wurden mit einem monoklonalen anti-GPIIb-IIIa-Antikörper vorbehandelt. Anschließend wurde das Endothel der ACC denudiert, und den Tieren wurden fluoreszenzmarkierte VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten injiziert. Das Adhäsionsverhalten wurde wiederum intravitalmikroskopisch analysiert. Die Vorinkubation mit dem blockierenden Antikörper verminderte die feste Adhäsion VASP<sup>-/-</sup>-defizienter Thrombozyten an die freigelegte subendotheliale Matrix deutlich (Reduktion um 62% im Vergleich zu PBS-vorbehandelte Thrombozyten). Die transiente Thrombozytenadhäsion war hingegen nicht signifikant verändert (Abb.13).

Dies unterstützt das Konzept, dass der Verlust der VASP-abhängigen GPIIb-IIIa-Inhibition zumindest teilweise dafür verantwortlich ist, dass die Adhäsion der VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten sowohl an das intakte Endothel als auch an Stellen geschädigter Gefäßwand, verstärkt ist.



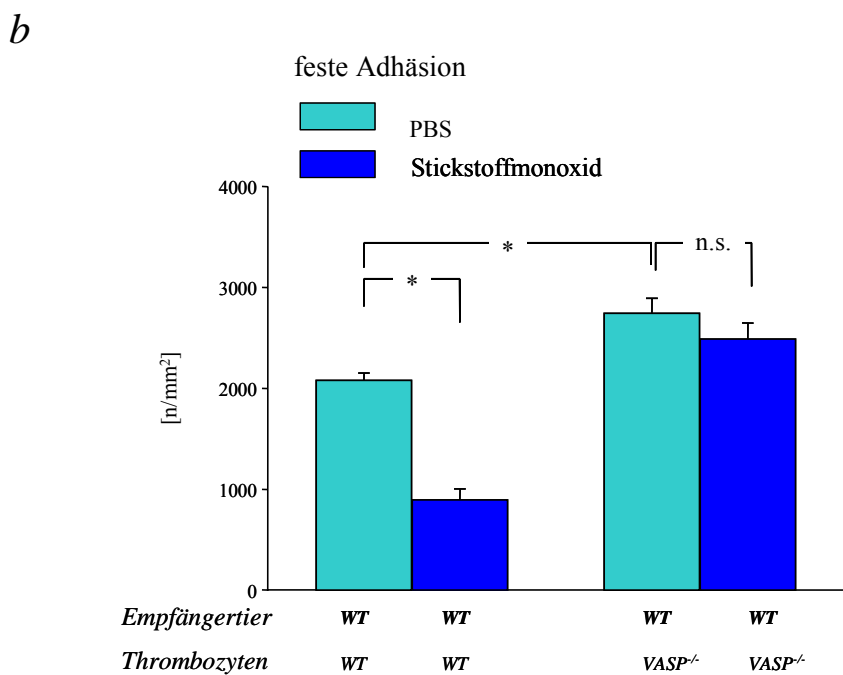
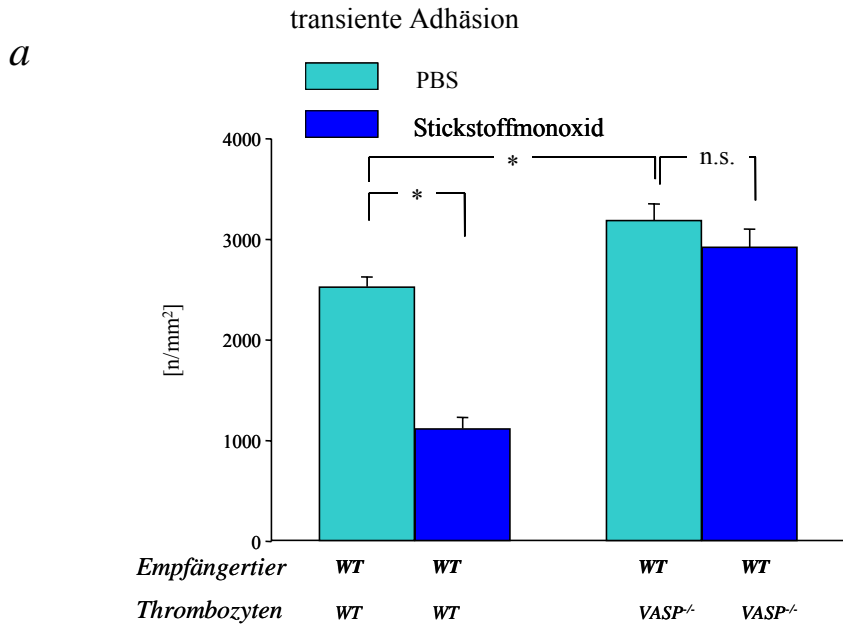
**Abbildung 13:**

*Der Einfluss von GPIIb-IIIa auf die lockere Adhäsion und die feste Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach endothelialer Denudation. Wildtypiere wurden mit 50µg anti-GPIIb-IIIa vorbehandelt. Anschließend wurde das Endothel der ACC denudiert. Die Darstellung fluoreszenzmarkierter Thrombozyten erfolgte intravitalmikroskopisch an der Stelle, an der das Gefäß verletzt war. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil der Anheftungs- und Adhäsionshemmung der Thrombozyten durch anti-GPIIb-IIIa (n=5) im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen (n=4). Mittelwert ± Standardfehler.*

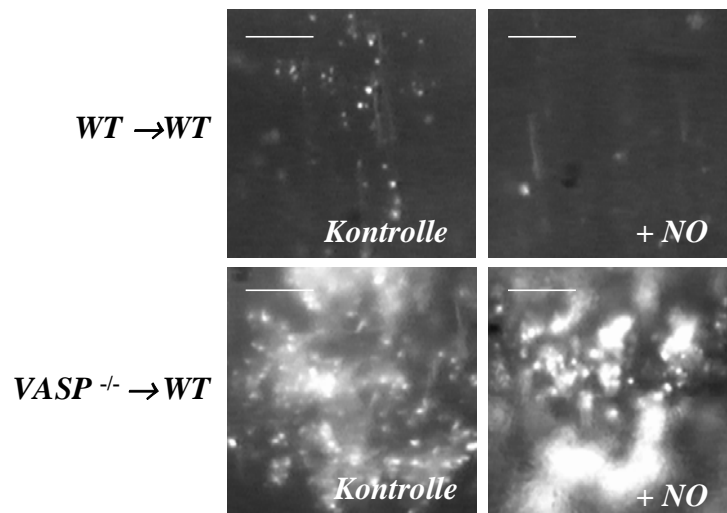
#### 4.2.4 VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten sprechen nicht auf Stickstoffmonoxid an

NO ist als außerordentlich wichtiger endogener Thrombozytenantagonist bereits bekannt.<sup>48,79</sup> Es bewirkt die Thrombozytenhemmung durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I.<sup>54</sup> Um festzustellen, ob VASP die NO/cGMP-abhängige Regulation der Thrombozytenadhäsion vermittelt, überprüften wir in einem weiteren Ansatz die Bedeutung von NO für das Adhäsionsverhalten von Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Fluoreszenzmarkierte Wildtyp- bzw. VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden mit dem NO-Donoren Spermine-NO vorbehandelt und anschließend mit Thrombin stimuliert. Mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Adhäsion thrombinaktivierter Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand der ACC von Wildtypmäusen dargestellt. In Wildtypthrombozyten, die mit NO vorbehandelt waren, sank die transiente Thrombozytenadhäsion an die geschädigte Gefäßwand um annähernd 56%, die feste Ad-

häsion sank um 57% (Abb.14 a-c). Bei VASP-defizienten Thrombozyten dagegen fehlte eine signifikante Antwort auf NO: Die transiente Thrombozytenadhäsion wurde um 8%, die feste Adhäsion um 9% reduziert ( $p < 0,05$  vs. Wildtypthrombozyten).







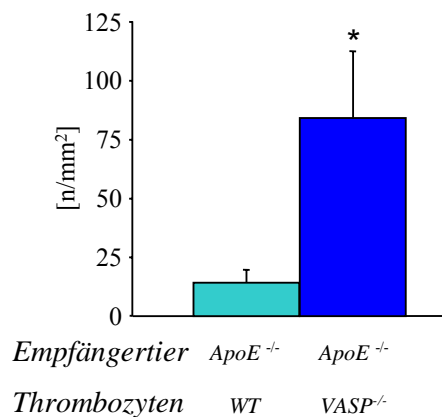
**Abbildung 14:**

*NO hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Fluoreszenzmarkierte Wildtyp- beziehungsweise VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten wurden mit PBS (Kontrolle) bzw. dem NO-Donoren Spermine-NO vorinkubiert. Es folgte eine Stimulation entweder mit 0,2U/ml Mausthrombin oder mit PBS. Die lockere Anheftung (a) und die feste Adhäsion (b) an die verletzte Gefäßwand der ACC wurde mithilfe intravitalmikroskopischer Aufnahmen analysiert. Mittelwerte ± Standardfehler, n=5 jeder Gruppe. \*: p < 0,05 vs. Kontrolltiere. (c) Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Adhäsion von Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach endothelialer Denudation in der Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit von Spermine-NO. Die Balken entsprechen 50 µm.*

#### 4.2.5 VASP reguliert die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion in der frühen Atherosklerose

Bei den initialen Ereignissen des atherogenen Prozesses ist die Adhäsion von Thrombozyten an das Gefäßendothel von zentraler Bedeutung. Sie geschieht schon früh im Verlauf der Atherosklerose und geht strikt der Leukozyteninfiltration und Plaqueformation voraus.<sup>56</sup> Um die Beteiligung von VASP an der Regulation der Thrombozytenadhäsion an der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand herauszuarbeiten, injizierten wir fluoreszenzmarkierte Wildtyp bzw. VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten in 10 Wochen alte *ApoE<sup>-/-</sup>*-Empfängermäuse, die zuvor über einen Zeitraum von 6 Wochen mit einer Cholesterindiät

gefüttert worden waren. Die Thrombozytenadhäsion an der Bifurkation der ACC untersuchten wir wiederum intravitalmikroskopisch. Die Adhäsion von Wildtypthrombozyten ( $ApoE^{+/+}$ ,  $VASP^{+/+}$ ) an das  $ApoE^{-/-}$ -Endothel war um den Faktor 2 gesteigert im Vergleich zu den Wildtypempfängertieren. Der Verlust von VASP in Thrombozyten führte zu einer weiteren Steigerung der Thrombozytenadhäsion in den atherosklerotisch veränderten Gefäßen von  $ApoE^{-/-}$ -Mäusen. Die Zahl der  $VASP^{-/-}$ -Thrombozyten, die fest an der Gefäßwand von  $ApoE^{-/-}$ -Mäusen adhärirten, ist nahezu um den Faktor 4 gestiegen im Vergleich zu  $VASP^{+/+}$ -Thrombozyten (Abb.15). Obwohl sowohl Thrombozyten als auch Endothelzellen VASP exprimieren, war allein der Verlust des thrombozytären VASP für die erhöhte Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen in atherosklerotisch betroffenen Mäusen verantwortlich. Dies macht deutlich, dass unter den *pathophysiologischen* Bedingungen der Atherosklerose das in der Gefäßwand exprimierte VASP nicht ausreicht, die Thrombozytenadhäsion zu vermindern.



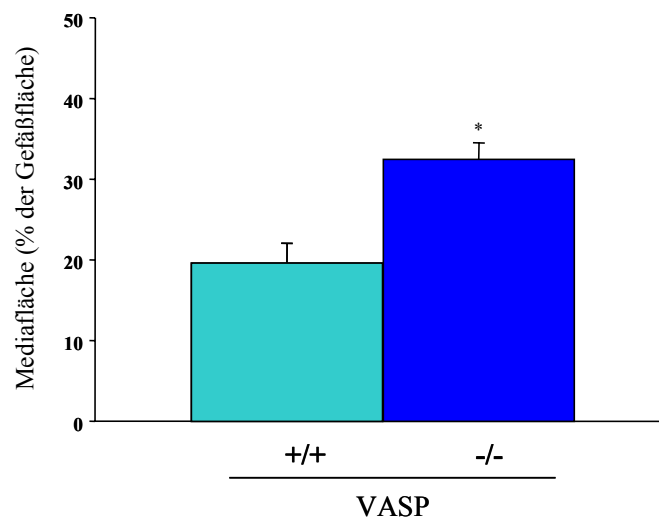
**Abbildung 15:**

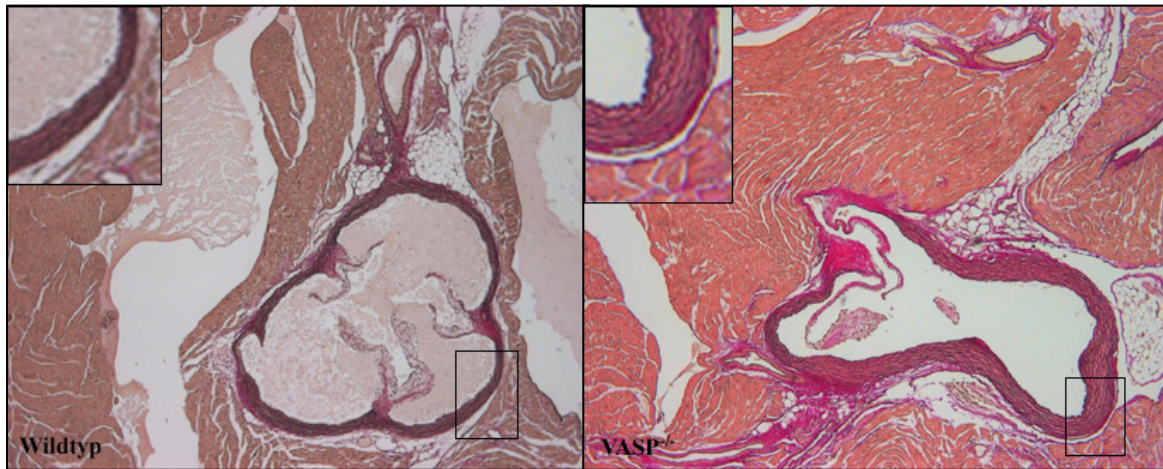
**Die Bedeutung von VASP für die Regulation der Thrombozytenadhäsion an die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand.  $ApoE^{-/-}$  Mäusen wurden Wildtyp- beziehungsweise  $VASP^{-/-}$ -Thrombozyten injiziert. Die Thrombozytenadhäsion wurde *in situ* in der rechten ACC fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*:  $p < 0,05$  vs. Wildtypen.**

#### 4.2.6 Der Verlust von VASP induziert die Mediahypertrophie

Um zu klären, inwieweit die bei VASP-Nullmutanten gesteigerte Thrombozytenadhäsion mit einer Steigerung fortgeschrittener atherosklerotischer Veränderungen einhergeht, erfolgte die histomorphometrische Analyse der morphologischen Veränderung im Bereich der Media. Die fortgeschrittene Atherosklerose zeigt sich besonders in der Media des Gefäßes. Hypertrophie und Sklerose sind histologisch deutlich zu erkennen und ihre Quantifizierung lässt eine Aussage über das Ausmaß und die Progredienz der Atherosklerose zu. Für die histomorphometrische Quantifizierung der Mediaproliferation in VASP<sup>-/-</sup>- beziehungsweise Wildtyp-Tieren, fertigten wir Serienschnitte der Aortenwurzel an und färbten sie anschließend zur Identifikation der einzelnen anatomischen Gefäßstrukturen mit Elastica van Giesson. Die histologischen Bilder der Aortenwurzel auf Höhe der Klappenebene werteten wir nach einem standardisierten Protokoll aus. Indem wir die von der Membrana elastica interna und externa begrenzten Mediafläche ins Verhältnis zur von der Membrana elastica externa (Grenzschicht zwischen Media und Adventitia) begrenzten Gesamtfläche des Gefäßes setzen, konnten wir schließlich das Ausmaß der Mediaproliferation in den Hauptgefäßen von VASP<sup>+/+</sup>- und VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen erfassen. Die Mediafläche ist als prozentualer Anteil der gesamten Gefäßfläche angegeben und hat sich bei VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu VASP<sup>+/+</sup>-Tieren nahezu verdoppelt. Hingegen zeigte sich kein Effekt auf die Intimaproliferation (*Abb.16 a,b*).

Es werden weitere experimentelle Untersuchungen notwendig sein, um die zugrunde liegenden Mechanismen der Mediaproliferation besser erklären zu können.





**Abbildung 16:**

*Der Einfluss von VASP auf das vaskuläre Remodeling. Darstellung des Querschnitts durch den Aortenursprung von Wildtyp- und VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen. (a) Die Fläche der Media wurde als prozentualer Anteil der gesamten Gefäßfläche berechnet. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n=6 jeder Vergleichsgruppe, \*:  $p < 0,05$  vs. Wildtyp-Tiere an. (b) Histologische Aufnahmen des Aortenursprungs bei 20facher Vergrößerung. Im linken Bild ist die Aorta mit der Basis der Taschenklappen und der abzweigenden Koronararterie einer Wildtypmaus dargestellt. Im rechten Bild sieht man die deutlich verbreiterte Aortenwand, ebenfalls mit der Basis der Taschenklappen und der abzweigenden Koronararterie einer VASP<sup>-/-</sup>-Maus.*

## 5 DISKUSSION

Zwischen dem Beginn atherosklerotischer Gefäßveränderung und der klinischen Ausprägung der Erkrankung liegt eine sehr große Zeitspanne. Dieser Zeitraum der prodromalen Phase ermöglicht präventive Maßnahmen, die nur verbessert werden können, wenn die Pathomechanismen der Initiation und Progression früher atherosklerotischer Läsionen weitgehend geklärt sind.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand des Tiermodells der VASP-Knockout-Maus der Einfluss des Proteins auf die Thrombozytenadhäsion an das Gefäßendothel in bestimmten physiologischen und pathophysiologischen Situationen deutlich gemacht werden. Des Weiteren soll die Regulation der Thrombozytenfunktion durch VASP im frühen atherosklerotischen Geschehen genauer untersucht werden.

### 5.1 DISKUSSION DER ANGEWANDTEN EXPERIMENTELLEN VERFAHREN

#### 5.1.1 Das Tiermodell

Kardiovaskuläre Erkrankungen unterliegen sehr komplexen und multifaktoriellen Prozessen. Ein besonderes Anliegen vieler Arbeitsgruppen ist es, herauszufinden, welche Zellinteraktionen und molekularen Mechanismen, aber auch welche genetischen und umweltbedingten Faktoren in jedem Stadium des Entstehungsprozesses beteiligt sind.<sup>11</sup> Für diese komplexen Fragen ist es erforderlich, ein *in vivo* Modell zu etablieren, das die zellulären Strukturen und die Morphologie des menschlichen Organismus möglichst genau imitieren kann. Experimente, die zu sehr von den Vorgängen im Menschen abweichen oder sich zu sehr auf *in vitro* Systeme stützen, können zu falschen Schlussfolgerungen führen.

Bei der Versuchsplanung stellte sich die Frage, an welchem Tiermodell die Untersuchungen vorgenommen werden sollten. Hier fiel die Wahl aus den folgenden Gründen auf die Maus: Ein besonderer Vorteil liegt in der genetischen Manipulierbarkeit der Maus. Die Herstellung bestimmter Knock-out-Stämme ist sehr gut erforscht und entwickelt.<sup>77,105</sup> Durch den Einsatz gezielter Mutationen, durch die die Synthese und damit Funktion bestimmter Proteine verhindert wird, erhält man Hinweise auf deren Wirkung und Einfluss als Regulatorproteine

gegeben. Im vorliegenden Fall ist es die Thrombozytenfunktion, deren Regulation durch das Protein VASP genauer analysiert werden sollte. Der gezielte Knockout dieses Proteins ermöglichte es uns, dessen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten an die Gefäßwand *in vivo* näher zu untersuchen.

Bei einem weiteren, ebenfalls in dieser Studie angewandten Modell, führt die gezielte Ausschaltung des Apolipoproteins E zur atheroprogredienten Entwicklung, die der des Menschen sehr ähnlich ist.<sup>11,87,108</sup> Die ApoE-defiziente Maus ist als Modell besonders für die frühe Atherosklerose geeignet, da spätere Stadien der Plaqueruptur nicht beobachtet werden können.<sup>68,108</sup> In vorangehenden Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte in intravitalmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es bereits vor der Manifestation atherosklerotischer Läsionen zu gesteigerten Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen im Bereich der Carotisbifurkation kam.<sup>56</sup> Ein weiterer Aspekt unserer aktuellen Untersuchungen war daher nun die Analyse der Beteiligung von VASP an der Regulation der Thrombozytenadhäsion an die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand. Aus diesem Grund griffen wir in der vorliegenden Studie auch auf dieses Knockoutmodell zurück.

Ein weiterer Vorteil des Mausmodells besteht darin, dass bestimmte Proteine, wie in diesem Fall GPIIb-IIIa, sowie P-Selektin, gezielt durch Antikörper blockiert werden können. Antikörper und anderen Reagenzien sind durch die weite Verbreitung des Mausmodells einfach kommerziell erhältlich und gut wirksam.

Einige praktische Argumente für die Auswahl des Versuchstiers sind die leichte Handhabbarkeit, Nachzucht und Verfügbarkeit der Maus. Ebenso ist die Größe der Maus ein weiterer vorteilhafter Aspekt. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wird durch die Schichtdicke des zu durchdringenden Gewebes limitiert. Die Gefäßwand der großen, herznahen Arterien einer Maus ist jedoch so dünn, dass Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen von der Adventitia aus beobachtet werden können. Bei größeren Tieren wäre das nicht möglich.<sup>52,68,108</sup>

### **5.1.2 Intravitalmikroskopische Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktionen**

Um die Thrombozytenadhäsion zu analysieren, benötigten wir eine Methode, mit der Interaktionen zwischen Zellen gezielt beobachtet und biologische Interaktionen zwischen Blutbestandteilen und der Gefäßwand besser verstanden werden konnten. Die Intravital-

mikroskopie ist hervorragend dafür geeignet, Aussagen über die *physiologischen* und *pathophysiologischen* Zellinteraktionen, sowie deren Auswirkung auf die Hämodynamik zu machen. Zusätzlich ist es möglich, mithilfe der Intravitalmikroskopie *physiologische* und *pathophysiologische* Prozesse direkt im lebenden Organismus, in einzelnen Zellen und Zellsystemen darzustellen. Der große Vorteil gegenüber *in vitro*-Versuchen besteht somit darin, dass sich die Zellen in ihrem physiologischen Milieu und unter den dort üblichen Flussbedingungen befinden.

Für die Zielsetzung dieser Arbeit wählten wir ein möglichst aussagekräftiges Untersuchungsgebiet. Bifurkationen und Gefäßabzweigungen sind der Hauptentstehungsort für Turbulenzen und dem Kontakt der zellulären Blutbestandteile mit der Gefäßwand. Zu den besonders relevanten Gebieten zählen die Abzweigung der Koronararterien, der Aortenbogen, die Aortenklappen und die ACC besonders im Bereich der Bifurkation in A. Carotis Interna und Externa.<sup>11,28,98</sup> Die *in vivo*-Untersuchung der Koronarien und der Aorta ist ein schwer zugängliches und nur mit erheblichem chirurgischen Aufwand durchzuführendes Unterfangen, welches zudem einen schwerwiegenden Eingriff in die Physiologie des Blutflusses darstellt. Die Exploration der ACC hingegen stellt durch den unkomplizierten chirurgischen Zugang und die schonend durchführbare Präparation einen weitaus geringeren und praktischeren Eingriff in den Organismus dar. Es war somit möglich, an unterschiedlichen Stellen der ACC den Blutfluss darzustellen und das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten direkt *in situ* zu untersuchen. Aus den genannten Gründen war diese Methode für unsere Studie besonders geeignet, die Erkenntnisse über Zell-Gefäßwandinteraktionen zu erweitern.

### **5.1.3 Histomorphometrische Charakterisierung und Quantifizierung der Atherosklerose**

Der Verlauf der Atherosklerose zeigt sich in Gefäßwandveränderungen, die sich auf histologischer Ebene darstellen lassen. Initial wird mikroskopisch eine Intimaverdickung und Schaumzellbildung (= Lipidspeichermakrophagen) sichtbar, die fortschreitend in eine Mediahypertrophie und Cholesterinkristalle enthaltende Nekrosen übergeht. Dies kann bis hin zur Plaqueruptur, Thrombusbildung, Aneurysmenbildung und Gefäßverschlüssen führen. Die Möglichkeit der mikroskopischen Darstellung dieser Vorgänge macht die Histologie zu einer

geeigneten Methode, die Ausmaße und vor allem die Progredienz der Atherosklerose darzustellen. Darüber hinaus ist es möglich, die Gefäßveränderungen mit Auswertungsprogrammen zu quantifizieren und die Ergebnisse untereinander zu vergleichen.

Der Aortensinus diente bereits in vielen Atherosklerosestudien der Maus als Grundlage für quantitative und qualitative Aussagen. Er stellt einen der wichtigsten Manifestationsorte der Atherosklerose dar. Aus bereits vorhandenen Vergleichsstudien wurde deutlich, dass die artherosklerotische Plaquebildung bevorzugt an Stellen des arteriellen Gefäßbettes auftreten, an denen starke Wirbelbildungen und hohe Scherkräfte wirken. Dies sind im Besonderen Gefäßabgänge, Klappen und Bifurkationen. Außerdem sind die Segel der Aortenklappe ein gut standardisierbarer Orientierungs- und Ausgangspunkt für Serienschritte.<sup>97</sup>

Wir wählten die Elastica van Giesson-Färbung, weil sie die anatomischen Gefäßstrukturen durch unterschiedliches Anfärben der einzelnen Bindegewebsbestandteile am differenziersten darstellen kann und sich damit besonders gut für unsere Auswertung eignete.

Mithilfe der Serienquerschnitte war es möglich, die komplette Ausdehnung der Plaque zu erfassen, sie durch histomorphometrische Auswertung zu quantifizieren und untereinander zu vergleichen. Dass wir mit unserer Methode die gesamte Plaquefläche erfasst hatten, wurde dadurch bestätigt, dass auf den Schnitten, die am weitesten von der Koronarabzweigung entfernt waren, nur noch intakte unveränderte Arterienwand zu sehen war. Die Abzweigung der Koronararterien diente uns als standardisierter Ausgangspunkt. Das Ausmessen von Serienquerschnitten und die dadurch ermöglichte Quantifizierung der Plaquefläche ist ein bereits in zahlreichen Studien angewandtes und bewährtes Verfahren.<sup>45,63,77</sup>

Ein Nachteil ist jedoch, dass keine funktionelle Aussage über den Pathomechanismus gemacht werden kann und, dass Läsionen erst in relativ weit fortgeschrittenem Stadium histologisch sichtbar werden. Deswegen eignet sich diese Methode zur Darstellung vorangeschrittener Läsionen. Sie gab uns einen Ausblick auf den möglichen Einfluss von VASP auf die Mediasklerose im Stadium fortgeschrittener Atherosklerose. Hierzu werden jedoch Folgestudien notwendig sein.

Das Auswertungsprogramm mithilfe einer entsprechenden Bildanalysesoftware ist durch seine schnelle und akkurate Handhabbarkeit die Methode der Wahl für Studien an Mausmodellen, die durch gezielte Mutation oder cholesterinreiche Fütterung signifikante artherosklerotische Gefäßveränderungen entwickeln. Es erlaubt zusätzlich den Vergleich mit



anderen Species.<sup>97</sup> Ein Nachteil besteht im Fehlen der dreidimensionalen Darstellbarkeit einer Läsion. Die Höhenlokalisierung und die Unterschiede zwischen frühen und fortgeschrittenen Läsionen im gleichen Areal werden nicht berücksichtigt. Erst in Kombination mit der Histomorphometrie (Anfertigen von Serienquerschnitten, die sich über die gesamte Läsion hinweg erstrecken) können zumindest über die Höhenlokalisierung nähere Angaben gemacht werden.

## 5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie bereits vorangegangener Studien der Arbeitsgruppe<sup>55,56</sup> macht die maßgebliche Beteiligung der Thrombozyten an initialen Mechanismen der Atherosklerose deutlich. Sie identifizieren zudem VASP als negativen Regulator der Adhäsion von Thrombozyten an die ungeschädigte, sowie auch an die pathologisch veränderte Gefäßwand. Dies konnte in der vorliegenden Studie unter *physiologischen* Bedingungen, sowie in verschiedenen *pathophysiologischen* Situationen *in vivo* gezeigt werden.

Die Thrombozytenadhäsion wird durch Stoffe, die die Konzentration von cAMP und cGMP erhöhen, deutlich inhibiert. Dies geschieht sowohl unter *physiologischen* Bedingungen, wie auch unter *pathophysiologischen* Bedingungen.<sup>49,78,93</sup> Die weiterführende Signaltransduktionskaskade, die in die cAMP- und cGMP-abhängige Inhibition der Thrombozytenadhäsion mit einbezogen ist, bleibt jedoch widersprüchlich. Ein hauptsächliches Substrat der cAK, sowie der cGK ist VASP, ein 46/50 kDa Protein, das in hohen Konzentrationen in Thrombozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert wird.<sup>30,72,101</sup> Die *in vivo* Bedeutung von VASP im Bezug auf die Thrombozytenfunktion war bisher wenig verstanden.

In der vorliegenden Studie nutzten wir die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, um direkt die Rolle von VASP für die Regulation der Thrombozyten Gefäßwandinteraktionen *in vivo* zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass VASP an der Hemmung der Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen unter *physiologischen* Bedingungen in der ACC und in der intestinalen Mikrozirkulation beteiligt ist. Darüber hinaus wurde durch den Verlust von VASP die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen (I) nach Ischämie und Reperfusion, (II) als Antwort auf eine endotheliale Denudation und (III) in atherosklerotisch veränderten Gefäßen bei Mäusen drastisch gesteigert. Sowohl P-Selektin als auch GPIIb-IIIa waren an Thrombozyten-

Endothelzellinteraktionen in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter *physiologischen* Bedingungen beteiligt. GPIIb-IIIa trug zur erhöhten Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach endothelialer Denudation an die subendotheliale Matrix bei.

Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse das Konzept, dass sowohl unter *physiologischen*, als auch unter *pathophysiologischen* Bedingungen, Mediatoren, die die Konzentration von cAMP- und cGMP erhöhen, die Thrombozytenadhäsion *in vivo* negativ beeinflussen. Zu diesen Stoffen zählen NO und Prostazyklin, die über VASP ihre Wirkung entfalten. Interessanterweise war allein der Verlust des thrombozytären VASP für die vermehrte Thrombozytenadhäsion nach Gefäßwandschädigung oder atherosklerotischer Veränderung verantwortlich. Im Gegensatz dazu war in Abwesenheit einer endothelialen Zeldysfunktion oder endothelialer Denudation der alleinige Verlust von thrombozytärem VASP nicht mit erhöhter Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verbunden. Daraus kann man wiederum schließen, dass die alleinige Anwesenheit von VASP in der Gefäßwand (Endothelzellen, glatten Muskelzellen) nicht ausreicht, die Thrombozytenadhäsion im Zustand endothelialer Dysfunktion oder nach Freilegung der subendothelialen Matrix zu verhindern.

Eine frühere Untersuchungen von Aszódi et al.<sup>3</sup> hat interessanterweise deutlich gemacht, dass VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten im Vergleich zu Wildtypthrombozyten einen schnelleren „shape change“ und eine schnellere Aggregation als Antwort auf Kontakt mit Kollagen zeigen. Ebenso war die agonisteninduzierte Fibrinogenbindung durch GPIIb-IIIa an die Thrombozytenoberfläche in der Abwesenheit von VASP deutlich erhöht. Die Veränderungen in der Thrombozytenfunktion, die in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden konnten, führten zu keiner Änderung der Blutungszeit der Mäuse. Wir konnten zeigen, dass Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen sogar unter *physiologischen* Bedingungen erhöht sind. Diese offensichtliche Diskrepanz vermag darauf schließen zu lassen, dass das Fehlen von VASP zu einer feinen Veränderung in der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen führt, die durch andere inhibitorische Wege während der Hämostase überdeckt werden. Hier ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass der Aussagewert der Blutungszeit und der Thrombozytenzählung über Ereignisse, die der normalen Hämostase zugrunde liegen, nicht erwiesen ist.<sup>86</sup> Dies bedeutet, dass es keinen klaren Zusammenhang zwischen reduzierter Blutungszeit und thrombotischem Risiko gibt.<sup>86</sup>

Im Gegensatz zu VASP<sup>-/-</sup>-Mutanten, zeigten Mäuse mit mangelhafter cGKI vermehrte Thrombozytenadhäsion nach Ischämie und Reperfusion, jedoch nicht unter Ruhebedingungen.<sup>54</sup> Dies weist darauf hin, dass unter *physiologischen* Bedingungen die Wirkung von einem der beiden, cGMP oder cAMP, ausreicht, die antiadhäsiven Eigenschaften der endothelialen Oberfläche aufrechtzuerhalten. Folglich kann im *physiologischen* Zustand ein Defekt der NO/cGKI/VASP-Kaskade durch Prostazyklin, das aus dem Endothel stammt und durch die nicht betroffene cAK/cAMP/VASP Kaskade wirkt, kompensiert werden.<sup>54,93</sup> In VASP-defizienten Mäusen war die Thrombozytenadhäsion auch ohne Verletzung der Gefäßwand signifikant erhöht. Dies unterstützt erneut die Hypothese, dass sich VASP an der Schnittstelle beider antiadhäsiv wirkender Signalkaskaden befindet und, dass der Verlust von VASP nicht durch den einen oder anderen cGKI- bzw. cAMP-abhängigen Signalweg kompensiert werden kann.

Bei Prostazyklin vermutet man, dass es der basalen Kontrolle der Thrombozytenaktivität in *physiologischem* Zustand dient.<sup>93</sup> Dagegen scheint NO und die nachfolgende Signalkaskade über cGMP und die cGKI besonders für die Inhibition der Thrombozyten-Gefäßwandinteraktion unter *pathophysiologischen* Bedingungen relevant zu sein.<sup>48,54</sup> Um nach dieser Erkenntnis der Bedeutung von VASP für die NO-abhängige Inhibition der Thrombozytenadhäsion unter *pathophysiologischen* Bedingungen weiter nachzugehen, bestimmten wir die Effekte von NO auf die Adhäsion von Wildtyp und VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach Verletzung der Gefäßwand. In Wildtypmäusen verminderte sich die Thrombozytenanheftung und -adhäsion an das geschädigte Gefäßsegment durch den Einfluss von NO deutlich. Im Gegensatz dazu hatte NO in VASP-defizienten Thrombozyten keinen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenrekrutierung an die Gefäßwand nach endothelialer Denudation. Folglich ist VASP für die NO-abhängige Inhibition der Thrombozytenadhäsion nach Verletzung des Gefäßes *in vivo* unerlässlich. Darüber hinaus kann der Verlust von VASP nicht durch andere Wege, die die cGKI einschließt, ersetzt werden. Eine Möglichkeit wäre, neben weiteren möglichen Wegen, die Phosphorylierung des Thromboxanrezeptors<sup>102</sup>, dem Substrat der Inositol 1,4,5-triphosphat rezeptorassoziierten cGMP Kinase (IRAG).<sup>2,92</sup>

Neuere Erkenntnisse verdeutlichen den Einfluss von VASP auf die Regulation der Adhäsionsrezeptoren, zu denen das P-Selektin gehört und auf den thrombozytären Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa. Sowohl P-Selektin als auch GPIIb-IIIa sind grundlegend an Thrombozyten-

Gefäßwandinteraktionen beteiligt. Hauser und seine Mitarbeiter berichteten bereits, dass VASP an der Hemmung der agonisteninduzierten P-Selektin Expression auf Thrombozyten beteiligt ist.<sup>13,33</sup> Zusätzlich dazu gibt es wachsende Erkenntnis über die Rolle von VASP bei der Modulation der GPIIb-IIIa Ligandenbindungsaffinität: (I) VASP und Integrine sind gemeinsam entlang hochdynamischer filamentärer Membranstrukturen lokalisiert.<sup>80,84</sup> (II) Die VASP-Phosphorylierung geht mit reduzierter Fibrinogenbindungsaffinität an GPIIb-IIIa einher.<sup>36</sup> (III) VASP<sup>-/-</sup>-Mutanten zeigen erhöhte Aktivierung des thrombozytären GPIIb-IIIa und vermehrte Aggregation auf Stimulation mit Kollagen.<sup>3,33</sup> (IV) Die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch niedrige Konzentrationen zyklischer Nukleotide ist in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert.<sup>3,33</sup> In der vorliegenden Studie zeigten wir zum ersten Mal *in vivo*, dass sowohl P-Selektin als auch GPIIb-IIIa grundlegend an der Rekrutierung von Thrombozyten in VASP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter *physiologischen* Bedingungen beteiligt ist. Darüber hinaus trägt GPIIb-IIIa zur festen Adhäsion von VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nach endothelialer Denudation der Arterienwand bei. Dies unterstützt die Annahme, dass der Verlust von VASP mit einer vermehrten P-Selektin und GPIIb-IIIa-Bereitstellung und -Aktivierung einhergeht. Hiermit wird die biologische Bedeutung des vasodilator-stimulated Phosphoproteins als ein negativer Regulator der Thrombozytenadhäsion weiter erhärtet.

Bedeutenderweise wurde gezeigt, dass NO die agonisteninduzierte GPIIb-IIIa Aktivierung auf Thrombozyten hemmt und die P-Selektin-Expression auf Endothelzellen und auf Thrombozyten abschwächt. Thrombozyten schütten nach Aktivierung große Mengen NO aus.<sup>21</sup> Sie scheinen deswegen die Fähigkeit zu besitzen, ihre Adhäsion und Aggregation durch NO-abhängige auto- und parakrine Mechanismen selbst zu regulieren. Die Basis unserer bisher gewonnenen Erkenntnisse beinhaltet, dass die Thrombozytenadhäsion an das Endothel in der Abwesenheit von VASP erhöht ist und VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten nicht auf Stickstoffmonoxid ansprechen. Vor diesem Hintergrund kann behauptet werden, dass der Verlust von VASP die NO-abhängige thrombozytäre auto- und parakrine Regulation unterbricht und mit vermehrter Aktivierung und Bereitstellung thrombozytärer und endothelialer Adhäsionsrezeptoren einhergeht. Dies zeigt sich in erhöhter P-Selektin-Oberflächenexpression und Fibrinogenbindungskapazität der Thrombozyten und Endothelzellen sowohl unter *physiologischen* als auch *pathophysiologischen* Bedingungen. Abgesehen von P-Selektin und GPIIb-IIIa werden vermutlich noch weitere Rezeptor-Ligandeninteraktionen durch den NO/VASP-Signalweg

gesteuert. Dazu zählen die GPVI- und die GPIa-IIa-Kollageninteraktionen. Unsere Beobachtungen einer erhöhten Thrombozytenadhäsion in VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten, was ein nahezu GPIIb-IIIa-unabhängiger Prozess zu sein scheint, unterstützt diese Annahme. Es werden jedoch weiterführende Studien notwendig sein, diese zusätzlichen Mechanismen näher zu analysieren.

Der exakte Mechanismus der VASP-abhängigen Regulation der P-Selektin Expression und der GPIIb-IIIa Funktion ist bisher noch nicht endgültig entschlüsselt worden. Man hat jedoch bereits herausgefunden, dass VASP an der Regulation des Aktinzytoskeletts<sup>5,13</sup> beteiligt ist und, dass die Phosphorylierung von VASP seine Interaktion mit Aktinfilamenten<sup>32</sup> und seine Lokalisation an fokalen Adhäsionsstellen in intakten Zellen<sup>94</sup> vermindert. Deshalb kann man annehmen, dass die VASP-abhängige Regulation der Integrine auf Thrombozyten im Zusammenhang mit einer Modulation des Aktinzytoskeletts steht. Daraus ergibt sich wiederum eine entsprechende Änderung in der Integrinanordnung und Ligandenbindungsaffinität. Ähnliche Mechanismen sind vermutlich auch der Grund für die VASP-abhängige  $\alpha$ -Granulaausschüttung mit nachfolgender P-Selektin Expression.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir *in vivo* die Beteiligung von VASP als negativen Regulator der Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand einerseits unter *physiologischen* Bedingungen deutlich gemacht haben. Andererseits ist der Verlust von VASP mit einer erhöhten Thrombozytenrekrutierung am postischämisch veränderten intestinalen Mikrogefäßsystem und mit signifikant verstärkter Thrombozytenadhäsion an die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand verbunden. Letzteres scheint besonders von Bedeutung zu sein, da man geringere Konzentrationen phosphorylierten VASPs in atherosklerotisch veränderten Gefäßen beobachtet hat. Die Hemmung der agonisteninduzierten Thrombozytenadhäsion durch den NO/cGMP Signalweg ist in VASP<sup>-/-</sup>-Thrombozyten deutlich eingeschränkt.

Diese Daten erweitern maßgeblich unsere Kenntnisse, inwiefern die Thrombozytenadhäsion *in vivo* reguliert wird und macht die Wichtigkeit des vasodilator-stimulated Phosphoproteins in diesem Prozess deutlich.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl die Thrombozytenadhäsion als auch ihre Aktivierung im Bereich der Gefäßwand stellen initiale Schritte innerhalb der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen dar. Diese Läsionen bilden die Vorstufe arterieller Thrombosen und stehen somit in engem Zusammenhang mit Gefäßverschlüssen und dem klinischen Bild des Myokardinfarkts und des Schlaganfalls.

Prostazyklin und Stickstoffmonoxid hemmen die Thrombozytenadhäsion, indem sie über cAMP und cGMP-abhängige Proteinkinasen eine wichtige inhibitorische Signaltransduktionskaskaden in Thrombozyten aktivieren. Ein wichtiges Zielsubstrat für die Proteinkinasen ist das vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP). Um die Bedeutung von VASP für die Thrombozytenregulation *in vivo* herauszuarbeiten, untersuchten wir in der vorliegenden Studie die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktionen an VASP-defizienten (VASP<sup>-/-</sup>) Mäusen. Unter *physiologischen* Bedingungen war die Thrombozytenadhäsion an die Endothelzellen in VASP-Nullmutanten signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen ( $p < 0,05$ ). Der Adhäsionsrezeptor P-Selektin und der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa waren entscheidend daran beteiligt. Unter *pathophysiologischen* Bedingungen verstärkte der Verlust von VASP die Thrombozytenadhäsion (I) an das Endothel postischämisch veränderter intestinaler Mikrogefäße, (II) an die subendotheliale Matrix nach endothelialer Denudation und (III) an atherosklerotisch veränderte Gefäßwände ApoE-defizienter Mäuse ( $p < 0,05$  vs. Wildtyp). Die gesteigerte Thrombozytenadhäsion in VASP-Nullmutanten sprach nicht auf Stickstoffmonoxid an ( $p < 0,05$  vs. Wildtypthrombozyten). Die gesteigerte Thrombozytenadhäsion bei VASP<sup>-/-</sup>-Tieren zeigte sich in einer gesteigerten Mediasklerose und -hypertrophie ( $p < 0,05$  vs. Wildtyp).

Diese Daten machen zum ersten Mal deutlich, dass VASP *in vivo* die Thrombozytenaktivität sowohl unter *physiologischen* als auch unter *pathophysiologischen* Bedingungen negativ beeinflusst. Hierdurch werden neue Horizonte in der Atheroskloseforschung eröffnet, indem die Wichtigkeit von VASP als weiterer Ansatzpunkt innovativer Diagnostik und neuer therapeutischer Ansätze deutlich gemacht wird.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahern-Djamali, S. M., A. R. Comer, C. Bachmann, A. S. Kastenmeier, S. K. Reddy, M. C. Beckerle, U. Walter, and F. M. Hoffmann, 1998, "Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains." *Mol. Biol. Cell* 9, 2157-2171.
2. Ammendola, A., A. Geiselhoring, F. Hofmann, and J. Schlossmann, 2001, "Molecular Determinants of the Interaction between the Inositol 1,4,5- Trisphosphate Receptor-associated cGMP Kinase Substrate (IRAG) and cGMP Kinase Ibeta." *J. Biol. Chem.* 276, 24153-24159.
3. Aszodi, A., A. Pfeifer, M. Ahmad, M. Glauner, X. H. Zhou, L. Ny, K. E. Andersson, B. Kehrel, S. Offermanns, and R. Fassler, 1999, "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function." *EMBO J.* 18, 37-48.
4. Azuma H., Ishikawa M., and Sekizaki S., 1986, "Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation." *Br J Pharmacol* 88, 411-415.
5. Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard, 1999, "The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation." *J Biol. Chem.* 274, 23549-23557.
6. Becker B.F., Heindl B., Kupatt C., and Zahler S., 2000, "Endothelial function and hemostasis." *Z. Kardiol.* 89, 160-167.

7. Bizzozero, J., 1882, "Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung." *Archiv für Pathologische Anatomie* 90, 261-332.
8. Body, S. C., 1996, "Platelet activation and interactions with the microvasculature." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27 Suppl 1, 13-25.
9. Bombeli, T., B. R. Schwartz, and J. M. Harlan, 1998, "Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and GPIIb/IIIa." *J. Exp. Med.* 187, 329-339.
10. Brecht D.S. and Snyder S.H., 1994, "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." *Annu. Rev. Biochem.* 63, 175-195.
11. Breslow, J. L., 1996, "Mouse models of atherosclerosis." *Science* 272, 685-688.
12. Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe, and U. Walter, 1994, "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets." *J. Biol. Chem.* 269, 14509-14517.
13. Castellano, F., C. Le Clainche, D. Patin, M. F. Carlier, and P. Chavrier, 2001, "A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane." *EMBO J.* 20, 5603-5614.
14. Chen, L. Y., P. Mehta, and J. L. Mehta, 1996, "Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxid synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function." *Circulation* 93, 1740-1746.



15. Chen, L. Y. and J. L. Mehta, 1996, "Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets." *J Cardiovasc Pharmacol* 27, 154-158.
16. Coller, B. S., 1995, "Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy." *Circulation* 92 , 2373-2380.
17. Dembinska KA, Zmuda A, Wenhrynowicz O, Stachura J, B. A. Peskar, and R. J. Gryglewski, 1993, "Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide." *Int J Tissue React* 15, 55-64.
18. Dimmeler, S., J. Haendeler, M. Nehls, and A. M. Zeiher, 1997, "Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like protease." *J Exp Med* 185, 601-607.
19. Drees, B., E. Friederich, J. Fradelizi, D. Louvard, M. C. Beckerle, and R. M. Golsteyn, 2000, "Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins." *J. Biol. Chem.* 275, 22503-22511.
20. Flores, N. A. and D. J. Sheridan, 1994, "The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia." *Cardiovasc. Res.* 28, 295-302.
21. Freedman, J. E., J. Loscalzo, M. R. Barnard, C. Alpert, J. F. Keaney, and A. D. Michelson, 1997, "Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment." *J. Clin. Invest.* 100, 350-356.
22. Frenette, P. S., R. C. Johnson, R. O. Hynes, and D. D. Wagner, 1995, "Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7450-7454.

23. Frenette, P. S., T. N. Mayadas, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner, 1996, "Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins." *Cell* 84 , 563-574.
24. Garcia Arguinzonis, M. I., A. B. Galler, U. Walter, M. Reinhard, and A. Simm, 2002, "Increased Spreading, Rac/p21-activated Kinase (PAK) Activity, and Compromised Cell Motility in Cells Deficient in Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP)." *J Biol. Chem.* 277, 45604-45610.
25. Gawaz, M. P., 2002, "physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases." Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
26. Gertler, F. B., A. R. Comer, J. L. Juang, S. M. Ahern, M. J. Clark, E. C. Liebl, and F. M. Hoffmann, 1995, "enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties." *Genes Dev.* 9, 521-533.
27. Gertler, F. B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, and P. Soriano, 1996, "Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics." *Cell* 87, 227-239.
28. Gimbrone, M., 1986, "Vascular endothelium: Nature's blood container." from "Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis." Churchill Livingstone, Edinburgh, p.1-21.
29. Haffner, C., T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S. M. Lohmann, and U. Walter, 1995, "Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP." *EMBO J* 14, 19-27.

30. Halbrugge, M. and U. Walter, 1989, "Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets." *Eur. J. Biochem.* 185, 41-50.
31. Halbrugge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter, 1990, "Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators." *J. Biol. Chem.* 265, 3088-3093.
32. Harbeck, B., S. Huttelmaier, K. Schluter, B. M. Jockusch, and S. Illenberger, 2000, "Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin." *J. Biol. Chem.* 275, 30817-30825.
33. Hauser, W., K. P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter, and M. Zimmer, 1999, "Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8120-8125.
34. Hawiger, J., S. Parkinson, and S. Timmons, 1980, "Prostacyclin inhibits mobilisation of fibrinogen-binding sites on human ADP- and thrombin-treated platelets." *Nature* 283, 195-197.
35. Henke, J., U. Roberts, K. Otto, C. Lendl, U. Matis, T. Brill, and W. Erhardt, 1996, "Clinical investigations of an i.m. combination anesthesia with fentanyl/climazolam/xylazine and postoperative i.v. antagonism with naloxone/sarmzenil/yohimbine in guinea pigs." *Tierärztl. Prax.* 24, 85-87.
36. Horstrup, K., B. Jablonka, P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, and U. Walter, 1994, "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition." *Eur. J. Biochem.* 225, 21-27.

37. Ignarro, L. J., Fukuto JM, Griseavagne JM, and et al., 1993, "Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate; comparison with enzymatically formed nitric oxide from l-arginine." *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8103-8107.
38. Iwashina, M., M. Shichiri, F. Marumo, and Y. Hirata, 1998, "Transfection of inducible nitric oxide synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cells." *Circulation* 98, 1212-1218.
39. Junqueira L.C. and Carneiro J., 1996, "Wandbau größerer Gefäße" in "Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie", Springer-Verlag, Berlin, New York, p.291-298.
40. Kieffer N. and Phillips D.R., 1990, "Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions." *Annu Rev Cell Biol* 6, 329-357.
41. Krause, M., A. S. Sechi, M. Konradt, D. Monner, F. B. Gertler, and J. Wehland, 2000, "Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton." *J. Cell Biol.* 149, 181-194.
42. Kroll M.H. and A. I. Schafer, 1989, "Biochemical mechanisms of platelet activation." *Blood* 74, 1181-1195.
43. Lawrence, D. W. and K. B. Pryzwansky, 2001, "The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading." *J. Immunol.* 166, 5550-5556.
44. Lefkovits, J., E. F. Plow, and E. J. Topol, 1995, "Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine." *N Engl J Med* 322, 1553-1559.

45. Li, L., E. Messas, E. L. Batista, Jr., R. A. Levine, and S. Amar, 2002, "Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model." *Circulation* 105, 861-867.
46. Lieberman, E. H., S. O'Neill, and M. E. Mendelsohn, 1991, "S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels." *Circ. Res.* 68, 1722-1728.
47. Lincoln, T. M., Komalavilas P., and Cornwell T.L., 1994, "Pleiotopic regulation of vascular smooth muscle cell tone by cyclic GMP-dependant protein kinase." *Hypertension* 23, 1141-1147.
48. Lloyd-Jones, D. M. and K. D. Bloch, 1996, "The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis." *Annu. Rev. Med.* 47, 365-375.
49. Luscher, T. F., 1993, "Platelet-vessel wall interaction: role of nitric oxide, prostaglandins and endothelins." *Baillieres. Clin. Haematol.* 6, 609-627.
50. Lusinskas, F. W. and Lawler J., 1994, "Integrins as dynamic regulators of vascular function." *FASEB J* 8, 929-938.
51. Marcus, A. J., Weksler BB, Jaffe F.A., and Broeckmann M.J., 1980, "Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured cells." *J Clin Invest* 66, 979-986.
52. Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach, and K. Messmer, 1998, "Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin." *Blood* 92, 507-515.

53. Massberg, S., G. Enders, F. C. Matos, L. I. Tomic, R. Leiderer, S. Eisenmenger, K. Messmer, and F. Krombach, 1999, "Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo." *Blood* 94, 3829-3838.
54. Massberg, S., M. Sausbier, P. Klatt, M. Bauer, A. Pfeifer, W. Siess, R. Fassler, P. Ruth, F. Krombach, and F. Hofmann, 1999, "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." *J Exp Med* 189, 1255-1264.
55. Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz, 2002, "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." *J. Exp. Med.* 196, 887-896.
56. Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, U. Heinzmann, and B. Nieswandt, 2003, "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." *J. Exp. Med.* 197, 41-49.
57. May, A., T. Kaelsch, S. Massberg, Y. Herouy, R. Schmidt, and M. Gawaz, 2002, "Engagement of GPIIb-IIIa (alphaIIb,beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells." *Circulation* 106, 2111-2117.
58. Mehta, J. L., P. Mehta, and D. Y. Li, 2000, "Nitric oxide synthase in adult red blood cells: Vestige of an earlier age or a biologically active enzyme." *J Lab Clin Med* 135, 430-431.

59. Mellion B.T., L. J. Ignarro, Ohlstein E.H., Pontecorvo E.G., Hyman A.L., and Kadowitz P.J., 1981, "Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators." *Blood* 57, 946-955.
60. Mendelsohn, M. E., S. O'Neill, D. George, and J. Loscalzo, 1990, "Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S- nitroso-N- acetylcysteine." *J. Biol. Chem.* 265, 19028-19034.
61. Michelson, A. D., S. E. Benoit, M. I. Furman, W. L. Breckwoldt, M. J. Rohrer, M. R. Barnard, and J. Loscalzo, 1996, "Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins." *Am. J. Physiol.* 270, 1640-1648.
62. Mollace V., D. Salvemini, E. Anggard, and J. Vane, 1991, "Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase." *Br J Pharmacol* 104, 633-638.
63. Montrucchio, G., G. Emanuelli, A. Venco, and G. Camussi, 1995, "Functional changes of the endothelium and atherosclerotic process." *Ann. Ital. Med. Int.* 10, 31-40.
64. Morgan, R. O. and A. C. Newby, 1989, "Nitroprusside differentially inhibits ADP-stimulated calcium influx and mobilization in human platelets." *Biochem. J* 258, 447-454.
65. Morgenstern, E., 1995, "The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial sections." *Eur. J. Cell Biol.* 68, 183-190.

66. Moro, M. A., R. J. Russel, S. Cellek, I. Lizasoain, Y. Su, V. M. Darley Usmar, M. W. Radomski, and S. Moncada, 1996, "cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1480-1485.
67. Murray, C. J. and A. D. Lopez, 1997, "Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study." *Lancet* 349, 1436-1442.
68. Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, and R. Ross, 1994, "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.
69. Niebauer, J., J. Dulak, J. R. Chan, P. S. Tsao, and Cooke J.P., 1999, "Gene transfer of nitric oxide synthase: effects on endothelial biology." *J Am Coll Cardiol* 34, 1201-1207.
70. Niebuhr, K., F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, U. D. Carl, U. Walter, F. B. Gertler, J. Wehland, and T. Chakraborty, 1997, "A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family." *EMBO J.* 16, 5433-5444.
71. Nieswandt, B., V. Schulte, W. Bergmeier, R. Mokhtari-Nejad, K. Rackebrandt, J. P. Cazenave, P. Ohlmann, C. Gachet, and H. Zirngibl, 2001, "Long-term anti-thrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice." *J. Exp. Med.* 193, 459-469.
72. Nolte, C., M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter, 1991, "Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors." *J. Biol. Chem.* 266, 14808-14812.



73. Nurden, A. T., 1986, "Platelet membrane glycoproteins and their role in platelet adhesion and aggregation." *Agents Actions Suppl* 20,29-44.
74. Obergfell, A., B. A. Judd, M. A. del Pozo, M. A. Schwartz, G. A. Koretzky, and S. J. Shattil, 2001, "The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 to the actin cytoskeleton." *J. Biol. Chem.* 276, 5916-5923.
75. Pabla, R., A. J. Buda, D. M. Flynn, S. A. Blesse, A. M. Shin, M. J. Curtis, and D. J. Lefer, 1996, "Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion." *Circ. Res.* 78, 65-72.
76. Paigen, B., A. Morrow, C. Brandon, D. Mitchell, and P. Holmes, 1985, "Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice." *Atherosclerosis* 57, 65-73.
77. Paigen, B., A. S. Plump, and E. M. Rubin, 1994, "The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia." *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 258-264.
78. Radomski, M. W., R. M. Palmer, and S. Moncada, 1987, "Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium." *Lancet* 2, 1057-1058.
79. Radomski, M. W., R. M. Palmer, and S. Moncada, 1987, "Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets." *Br. J. Pharmacol.* 92, 181-187.
80. Reinhard, M., M. Halbrugge, U. Scheer, C. Wiegand, B. M. Jockusch, and U. Walter, 1992, "The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts." *EMBO J.* 11, 2063-2070.

81. Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B. M. Jockusch, and U. Walter, 1995, "The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins." *EMBO J.* 14, 1583-1589.
82. Reinhard, M., K. Jouvenal, D. Tripier, and U. Walter, 1995, "Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7956-7960.
83. Reinhard, M., M. Rudiger, B. M. Jockusch, and U. Walter, 1996, "VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs." *FEBS Lett.* 399, 103-107.
84. Reinhard, M., T. Jarchau, and U. Walter, 2001, "Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins." *Trends Biochem. Sci.* 26, 243-249.
85. Reininger, A. J., Korndorfer M.A, and Wurzinger L.J., 1998, "Adhesion of ADP- activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin  $\alpha$ II $\beta$ <sub>3</sub>." *Thromb Haemost* 79, 998-1003.
86. Rodgers and J. Levin, 1990, "A critical reappraisal of bleeding time." *Semin Thromb Hemost* 16, 1-20.
87. Ross, R., 1999, "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340, 115-126.
88. Rousseau, G., D. Hebert, D. Libersan, A. Khalil, G. St Jean, and J. G. Latour, 1993, "Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs." *Am. Heart J.* 125, 1553-1563.
89. Rösen P., 2002, "Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose." *J. Kardiol* 9, 556-562.

90. Schafer, A. I., Alexander R.W., and R. I. Handin, 1980, "Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators." *Blood* 55, 649-654.
91. Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth, 2000, "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." *Nature* 404 , 197-201.
92. Schwarz, U. R., U. Walter, and M. Eigenthaler, 2001, "Taming platelets with cyclic nucleotides(1)." *Biochem. Pharmacol.* 62, 1153-1161.
93. Smolenski, A., C. Bachmann, K. Reinhard, P. Honig-Liedl, T. Jarchau, H. Hoschuetzky, and U. Walter, 1998, "Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody." *J Biol. Chem.* 273, 20029-20035.
94. Smolenski, A., W. Poller, U. Walter, and S. M. Lohmann, 2000, "Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I." *J. Biol. Chem.* 275 , 25723-25732.
95. Sneddon, J. M. and J. R. Vane, 1988, "Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2800-2804.
96. Tangirala, R. K., E. M. Rubin, and W. Palinski, 1995, "Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice." *J. Lipid Res.* 36, 2320-2328.
97. Thompson, J. S., 1969, "Atheromata in an inbred strain of mice." *J. Atheroscler. Res.* 10, 113-122.

98. Tunstall-Pedoe H and Vanuzzo D, 2000, "Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations." *Lancet* 355, 688-700.
99. Vogel, S. N., 1999, "Cholesterol lowering and endothelial function." *Am J Med.* 107, 479-487.
100. Waldmann, R., M. Nieberding, and U. Walter, 1987, "Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases." *Eur. J. Biochem.* 167 , 441-448.
101. Walter, U., M. Eigenthaler, J. Geiger, and M. Reinhard, 1993, "Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets." *Adv. Exp Med Biol.* 344,237-249.
102. Wang, G. R., Y. Zhu, P. V. Halushka, T. M. Lincoln, and M. E. Mendelsohn, 1998, "Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4888-4893.
103. Watson, S., O. Berlanga, D. Best, and J. Frampton, 2000, "Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid?" *Platelets.* 11, 252-258.
104. Wertheimer, S. J., C. L. Myers, R. W. Wallace, and T. P. Parks, 1992, "Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate." *J. Biol. Chem.* 267, 12030-12035.
105. White, J. G., 1994, "Anatomy and structural organization of the platelets." *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.*

106. Wildhirt, S. M., H. Suzuki, D. Horstman, S. Weismuller, R. R. Dudek, K. Akiyama, and et al., 1997, "Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction." *Circulation* 96, 1616-1623.
107. Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda, 1992, "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." *Science* 258, 468-471.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	Ena	Drosophila Enabled Protein
µg	Mikrogramm	EVH	Ena-VASP-homolge Domäne
µl	Mikroliter	Evl	Ena- VASP- like
µm	Mikrometer	Fa.	Firma
A.	Arteria (lat.)	GP	Glykoprotein
Abb.	Abbildung	GTP	Guanosintriphosphat
Abl	Abelson Thyrosinkinase	HBO	Kurzbogenhöchstdrucklampe
AK	Antikörper	I/R	Ischämie/Reperfusion
ApoE	Apolipoprotein E	IVM	Intravitalmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat	mAK	monoklonale Antikörper
bzw.	beziehungsweise	Mena	mammalian enabled Protein
cAK	cAMP- abhängige Proteinkinase	ml	Milliliter
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	MW	Mittelwert
CCD	charged-coupled-device	nm	Nanometer
cGKI	cGMP- abhängige Proteinkinase	NO	Stickstoffmonoxid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	NOS	NO- Synthase
DCF	Dichlordihydrofluoreszin- Diacetat	PAF	Thrombozytenaktivierender Faktor
Empf.	Empfänger	PBS	phosphat buffered saline
		PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
		PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
		PRP	platelet rich plasma

RCM	Coverslipping Machine	VASP	Vasodilator-Stimulated- Phosphoprotein
rpm	rounds per minute		
SEM	Standard error mean	VASP <sup>-/-</sup>	VASP-defizient
TBS	Tissue Block System	vs	versus (Vergleich)
TST	Tissue Stainer	vWF	von Willebrand Faktor
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>	WT	Wildtyp
Tz	Thrombozyten	z.B.	zum Beispiel
V.	Vena (lat.)		

## 9 DANKSAGUNG

Dank gilt allen, die Anteil an dieser Dissertation haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Steffen Massberg. Durch die Aufnahme in die Arbeitsgruppe ermöglichte er mir die wissenschaftliche Arbeit in motivierender und kooperativer Atmosphäre. Für seine Geduld, stets gewinnbringende Unterstützung und hervorragende Betreuung über den gesamten Zeitraum der Arbeit möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz für seine wegweisende Ratschläge, seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und fachliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich dem ganzen Laborteam der kardiologischen Forschung des Deutschen Herzzentrum für die tatkräftige und kompetente Hilfe danken. Mein ganz besonderer Dank geht hier an Frau Dr. med. vet. Ildiko Konrad für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und geduldige Einarbeitung.

Ein herzlicher Dank geht auch die pathologische Abteilung des Klinikums Rechts der Isar, die wesentlich zum Gelingen der Histopathologie beigetragen hat.

Ich möchte mich besonders bei Kathrin Hemler für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Wir konnten uns bei den Versuchsreihen stets gegenseitig unterstützen.

Schließlich danke ich meiner Familie und Freunden, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.